



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**

**Centro de Ciências Biológicas**

**Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia**

**Laboratório de Imunologia Aplicada**

Thais Helena Costa Girão Borges

**TRIAGEM *IN VITRO* DE COMPOSTOS NATURAIS COM  
POTENCIAL AÇÃO CONTRA O VÍRUS DA RAIVA.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Curso de Ciências Biológicas da Universidade  
Federal de Santa Catarina como requisito  
obrigatório para obtenção do grau de Bacharelado.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti

Florianópolis, 2012



Thais Helena Costa Girão Borges

**TRIAGEM *IN VITRO* DE COMPOSTOS NATURAIS COM  
POTENCIAL AÇÃO CONTRA O VÍRUS DA RAIVA.**

Este trabalho foi julgado adequado para obtenção do Título de “Graduado”, e aprovado em sua forma final pelo Programa de Graduação em Ciências Biológicas.

Florianópolis, 24 de fevereiro de 2012.

**Banca examinadora:**

---

Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti

---

Ms. Caroline Seibert Heidrich

---

Ms. Douglas Bardini Silveira

---

Prof. Dr. Artur Smânia Júnior

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe Thelma por sempre me apoiar em tudo que faço e por sempre torcer por mim a cada passo que eu dou. Ao meu irmão Lauro que está sempre do meu lado e por dividir comigo nosso grande objetivo. Ao meu irmão Luciano, pela torcida, carinho e apoio e que mesmo morando tão longe, está sempre muito próximo.

Ao Richard pelo companheirismo e amor, por todos os momentos que estamos juntos, por me acalmar quando eu preciso e me fazer rir mesmo quando estou chorando. Obrigada por me ajudar a crescer e me tornar forte. Você e minha família são as pessoas mais preciosas que eu tenho e é por vocês que tento ser uma pessoa melhor a cada dia.

Aos meus grandes amigos Luan, Tefa, Kamille, Yuri, Ingrid, Bruna, Felipe, Mafalda, e Cecilia. Obrigada por todas as festas, reuniões, horas felizes. Obrigada por todas as risadas. Sem dúvidas os últimos cinco anos foram os melhores até hoje por que vivemos tudo isso juntos. Cada um de nós está saindo da faculdade bem diferente de como entrou, seja no jeito de ser, na maturidade, cabelos, namorados, rugas... mas uma coisa que realmente espero que não mude é o nosso sentimento um pelo outro. Mesmo que o tempo nos afaste, espero que sempre que lembrarmos uns dos outros, que seja com carinho e saudade de um tempo bom.

Aos amigos do LIA, Luan, Aguinaldo, Carol, Nana, Elis, Douglas, Dudu, Anderson, Kamille, Yuri, obrigada pelas conversas de bancada, pelas nossas festinhas de fim de ano, pelos conselhos e pelas manchas roxas que ganhamos no paintball. Quero levar a amizade de vocês sempre comigo.

Ao professor Zanetti por ser além de um grande professor, um amigo. Obrigada por me orientar não só neste trabalho, mas também em ensinamentos que me fazem querer ser uma pessoa melhor.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho, a minha eterna gratidão.

Muito obrigada!  
Thais Costa

## RESUMO

**Palavras-chave:** Vírus rábico, célula McCoy, efeito citopático, MTT, *Ganoderma*, triterpenóides, esteróis.

A raiva é uma das doenças mais conhecidas no mundo e é descrita desde a Antiguidade quando se acreditava que ao acometer homens ou cães os deixava “loucos”.

Louis Pasteur desenvolveu a primeira vacina anti-rábica há mais de 100 anos. Ela foi produzida a partir de vírus atenuado originado de tecido nervoso dissecado. Desde então, a vacinação vem sendo utilizada sistematicamente como medida profilática pós-exposição, em seres humanos.

Este trabalho teve como objetivo fazer triagem *in vitro* de alguns compostos naturais para verificação da potencial atividade contra a infecção rábica.

A linhagem celular utilizada neste trabalho foi a linhagem de células McCoy, que apresenta grande permissividade ao vírus rábico, permitindo sua multiplicação em seu interior e visualização de efeito citopático, reprodutível, e de fácil observação em microscópio óptico invertido.

Foram avaliadas, através da inibição do efeito citopático, as atividades antivirais de 9 compostos extraídos do fungo *Ganoderma*, os quais apresentaram menores efeitos citotóxicos sobre as células McCoy.

O gênero *Ganoderma* tem grande importância e tem sido utilizado há mais de dois milênios na medicina tradicional da China e do Japão para o tratamento de diversas doenças humanas. Acredita-se que seu consumo regular tenha efeitos positivos na vitalidade e longevidade.

Diversos grupos de compostos podem ser extraídos de *Ganoderma* spp., sendo eles isolados principalmente do micélio e corpo frutífero. Os efeitos de importância farmacêutica são atribuídos principalmente aos polissacarídeos e triterpenóides.

Em *Ganoderma* são encontrados mais de 100 triterpenos, como ácidos aplanoxídicos, sendo que a maioria dos triterpenos isolados de *Ganoderma* spp. não são encontrados em outros gêneros. São considerados como potenciais agentes antitumorais, pois possuem citotoxicidade contra células tumorais. Triterpenos possuem também atividade contra proteases do vírus HIV-1 e HIV-2.

Os esteróis GA1 e GA2, também extraídos de *Ganoderma* spp., assim como os ácidos aplanoxídicos A, C, F e G demonstraram possuir atividade antifúngica contra *Microsporum canis* e *Trichophyton mentagrophytes*, agindo na inibição de crescimento, em concentrações de 500 a 1000µg/ml.

Neste estudo não foram encontrados resultados significativos.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
1.1. Histórico .....	10
1.2. Morfologia .....	12
1.3. Classificação .....	14
1.4. Epidemiologia .....	16
1.5. Transmissão .....	21
1.6. Diagnóstico .....	25
1.7. Profilaxia .....	27
1.8. Drogas antivirais .....	30
1.9. O Gênero <i>Ganoderma</i> .....	32
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>35</b>
2.1. Objetivos Gerais .....	35
2.2. Objetivos específicos .....	35
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>36</b>
3.1. Linhagem celular .....	36
3.2. Meio de cultura celular e reagentes .....	36
3.3. Cultivo e manutenção celular .....	36
3.4. Cepa viral .....	37
3.5. Produção viral .....	37
3.6. Determinação do título viral a partir da visualização de efeito citopático .....	38
3.7. Compostos e preparação de soluções-estoque .....	40
3.8. Avaliação da concentração citotóxica (CC <sub>50</sub> ) através do ensaio colorimétrico com sal de Tetrazólio (MTT) .....	44
3.9. Avaliação da potencial ação antiviral contra o vírus rábico <i>in</i> <i>vitro</i> através da redução do efeito citopático .....	46
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
4.1. Determinação do título viral a partir da visualização de efeito citopático .....	49



4.2. Avaliação da citotoxicidade através do ensaio do MTT .....	50
4.3. Triagem da potencial atividade anti-rábica através da observação de inibição do efeito citopático viral .....	57
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>72</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>73</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Histórico

A raiva é uma das doenças mais conhecidas no mundo e é descrita desde a Antiguidade quando se acreditava que ao acometer homens ou cães os deixava “loucos”.

A palavra raiva tem origem no latim, “rabere” e significa fúria ou delírio, e no sânscrito “rabhas”, significa “tornar-se violento”. Na Grécia Antiga a doença foi denominada *lyssa*, a qual significa loucura (Wilkinson, 2002; Kotait *et al.*, 2009).

Por séculos a imagem de um cão louco representa o medo da humanidade a esta doença, como foi expresso por escritores, legisladores, praticantes de medicina e filósofos. Como por exemplo, desde 2300 a.C., na Mesopotâmia, documentos legais dissertavam sobre como donos de animais raivosos eram considerados responsáveis por quaisquer mortes resultantes de suas mordidas (Wilkinson, 2002).

Celsus, um médico romano do século I d.C., se preocupava em estudar a transmissão da raiva à humanos, a sua profilaxia e as medidas a serem tomadas uma vez que a hidrofobia se manifestasse. Ele escreveu sobre a medida essencial de cauterização das feridas e subsequentemente a necessidade de manter a mesma aberta para que o “vírus” pudesse sair livremente. Naquela época, a palavra vírus, em latim, se referia a “veneno” ou “líquido viscoso”, uma descrição para a saliva raivosa (Wilkinson, 2002).

Antes do surgimento da vacinação, concebida por Louis Pasteur, na década de 1880, os métodos de tratamento contra a hidrofobia de Celsus eram os mais bem aceitos e aplicados (Wilkinson, 2002).

Um de seus tratamentos consistia em jogar o paciente, inadvertidamente, em tonéis de água, a partir do momento que os sintomas se instalassem. Caso o paciente conseguisse nadar, era

necessário empurrá-lo para debaixo d'água em intervalos regulares para que ele pudesse bebê-la mesmo contra sua vontade; caso o paciente não soubesse nadar, a solução seria deixá-lo se afogar por um período de tempo e depois puxá-lo para fora do tonel e esse tratamento faria com que o paciente perdesse o medo de água. Tais tratamentos podem ter sido eficazes no caso de reações histéricas, porém não para a cura da raiva (Wilkinson, 2002).

Plínio, contemporâneo de Celsus, recomendava outras formas de tratamento como, aplicação, nos ferimentos, de graxa misturada com cal ou cinzas da cabeça de um cão. A crença nessas e em outras terapias continuou por todo o século XIX (Wilkinson, 2002).

George Zink demonstrou em 1802 que a doença pode ser transmitida através da saliva de animais infectados para animais sadios, e que algum agente presente nesta saliva causava a doença (Schnell *et al.*, 2011).

Ainda no século XIX, Pierre-Victor Galtier foi a primeira pessoa a demonstrar que a doença poderia ser transferida entre espécies diferentes. Seus estudos foram continuados e ampliados por Louis Pasteur. Pasteur foi quem descobriu que o agente infeccioso da raiva se abriga no cérebro do animal infectado e em 1885, desenvolveu a primeira vacina contra a raiva, com vírus obtido da medula de coelhos infectados (Schnell *et al.*, 2011).

Louis Pasteur desenvolveu a primeira vacina anti-rábica há mais de 100 anos. Ela foi produzida a partir de vírus atenuado originado de tecido nervoso dissecado. Desde então, a vacinação vem sendo utilizada sistematicamente como medida profilática pós-exposição, em seres humanos (WHO, 2002).

A cepa utilizada no desenvolvimento da vacina foi escolhida por Louis Pasteur dentre outras cepas obtidas por ele por mostrar melhores resultados na imunização de cães. A cepa PV (*Pasteur Virus*)

foi isolada a partir de vírus rábico de rua em novembro de 1882. Os registros de Pasteur mostram que o vírus desta cepa foi considerado fixado após 50 passagens e após 90 passagens, essa cepa foi utilizada na vacinação humana pela primeira vez, em 1885 (Lépine, 1938).

## 1.2. Morfologia

O vírus rábico possui a forma de um projétil, como representado na figura 1, sendo uma extremidade plana e a outra côncava. Possui tamanho médio de 180nm e 75nm de diâmetro (WHO, 2002).

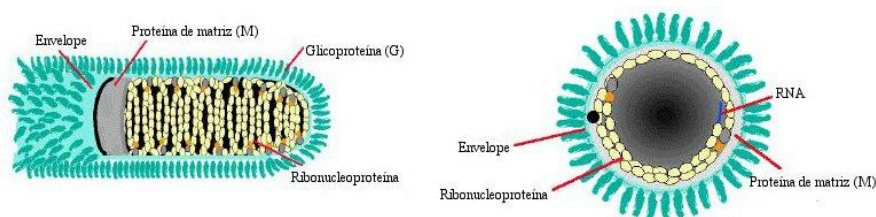


Figura 1: Esquema da estrutura do vírus rábico

Fonte: <http://www.cdc.gov/rabies/transmission/virus.html>

Seu genoma é de RNA e codifica cinco proteínas estruturais. São elas, RNA polimerase RNA-dependente (L), glicoproteína de superfície (G), nucleoproteína (N), fosfoproteína (NS) e proteína matriz (M) (WHO, 2002; WHO, 2005; Kotait *et al.*, 2009).

O envelope, formado por uma membrana dupla fosfolipídica de origem celular hospedeira, possui espículas de glicoproteína de 9nm. Ao envelope estão associadas duas proteínas, sendo elas: M, uma proteína interna ao envelope e a G, a qual é uma proteína transmembrana glicosilada. A glicoproteína (G) tem um papel muito importante na patogênese viral, pois é ela quem é responsável pelo reconhecimento de receptores específicos na superfície celular, portanto controla um dos

aspectos do neurotropismo do vírus rábico. Além disso, induz a síntese de anticorpos neutralizantes após a sua apresentação, pelas células infectadas, aos linfócitos do hospedeiro (Prehaud *et al.*, 1988; WHO, 2002; Kotait *et al.* 2009).

O nucleocapsídeo é helicoidal formado por uma fita de RNA simples, não segmentada e de polaridade negativa envolta por três proteínas (L, NS e N) (Prehaud *et al.*, 1988). O complexo ribonucleocapsídeo assegura a transcrição e replicação de seu genoma no citoplasma (WHO, 2005).

A partícula viral completa possui de 2 a 3% de ácido ribonucleico, 67% de proteínas, 26% de lipídeos e 3% de carboidratos (Kotait *et al.*, 2009).

O vírus rábico é sensível aos solventes de lipídeos como sabão, éter e acetona, bem como, álcool a 45-70%, preparados iodados e compostos de amônia quaternária. É bastante resistente à dessecação e também ao congelamento e descongelamento sucessivos. Tem certa estabilidade a pH entre 5 e 10, sensível às temperaturas de pasteurização e também à luz ultravioleta. À temperatura de 60° C, por alguns segundos, o vírus é inativado e à temperatura de 4° C, se mantém infeccioso por vários dias (Turner & Kaplan, 1967; WHO, 2002).

Existem dois tipos de vírus clássicos da raiva: o vírus de “rua”, que são cepas isoladas de animais infectados por ciclos de transmissão natural da doença. Os vírus de “rua” possuem um período de incubação bastante variável e muitas vezes bastante prolongado em oposição ao segundo tipo, denominados de vírus “fixo”, os quais apresentam período de incubação curto, de 4 a 7 dias, e são utilizados para a produção de vacinas bem como testes laboratoriais.

A cepa viral PV é uma cepa de vírus fixo, obtida a partir de repetidas passagens que Louis Pasteur realizou em coelhos por inoculação via intracerebral (Lépine, 1938). As repetidas passagens

levaram a uma mudança nos efeitos do vírus e a uma aparente mutação de suas características. A permanência e irreversibilidade dessas mudanças ao longo de várias passagens é o que caracteriza um vírus fixo, ou seja, quando um vírus de rua se adapta a um hospedeiro (Lépine, 1938).

Dentre outras, há também a cepa de vírus fixo CVS (*Challenge Virus Standart*). Esta cepa é bastante utilizada como modelo experimental para o estudo da patogenicidade do vírus rábico. É patogênica para animais de grande porte, pela via intracerebral e manifesta sintomas bastante representativos da raiva (Coulon *et al.*, 1989; Kotait *et al.*, 2009).

As principais características de um vírus fixo são regularidade do tempo de incubação, regularidade dos sintomas causados e título de virulência cerebral constante (Lépine, 1938).

### **1.3. Classificação**

O vírus rábico pertence à família Rhabdoviridae, gênero *Lyssavirus*, espécie *Rabies virus* (Badrane *et al.*, 2001; WHO, 2002; Carneiro *et al.*, 2009; Vieira *et al.*, 2010).

Os vírus pertencentes a esta família possuem genoma de RNA com polaridade negativa, linear e não segmentado.

O gênero *Lyssavirus* possui de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Virus - ICTV- sete espécies distintas como mostrado no quadro 1.

Quadro 1: Classificação das espécies de vírus pertencentes ao gênero *Lyssavirus*.

Filogrupo	Genótipo	Espécie	Origem geográfica	Potenciais vetores
I	1	<i>Rabies virus</i>	Distribuição mundial	Carnívoros e quirópteros
I	4	<i>Duvenhage virus</i>	Sul da África	Morcegos insetívoros
I	5	<i>European bat lyssavirus type I</i>	Europa	Morcegos insetívoros ( <i>Eptesicus serotinus</i> )
I	6	<i>European bat lyssavirus type II</i>	Europa	Morcegos insetívoros ( <i>Myotis</i> sp.)
II	2	<i>Lagos bat virus</i>	África subsaariana	Morcegos frugívoros
II	3	<i>Mokola virus</i>	África subsaariana	Desconhecido
I	7	<i>Australian bat lyssavirus</i>	Austrália	Morcegos frugívoros e insetívoros

Fonte: WHO, 2005

A espécie *Rabies virus*, vírus clássico da raiva, causa infecção em mamíferos e pertence ao genótipo 1 (WHO, 2002; Vieira *et al.*, 2010; WHO, 2011). Este é o único genótipo de *Lyssavirus*, até o momento, identificado na América do Sul (Teixeira *et al.*, 2005).

O genótipo 2 é representado pelos vírus da espécie *Lagos bat virus*, isolado pela primeira vez de morcegos frugívoros da região dos Lagos, Nigéria. O *Mokola virus*, representa o genótipo 3, e foi isolado de mussaranhos e de humanos, também na Nigéria, bem como de felinos do Zimbábue e Etiópia. O genótipo 4, *Duvenhage virus* foi isolado de humanos e morcegos insetívoros da África do Sul e do Zimbábue. Os genótipos 5 e 6, *European bat lyssavirus 1* e *European bat lyssavirus 2*, respectivamente, foram isolados de diferentes espécies de morcegos na Europa (Kotait *et al.*, 2009; Vieira *et al.*, 2010).

Na década de 1990, foi isolada na Austrália uma nova cepa de vírus conhecida como *Australian bat lyssavirus*, classificada como genótipo 7 (Kotait *et al.*, 2009).

A diferença entre os sete genótipos se dá pela caracterização genética dos genes N, o qual codifica uma nucleoproteína associada ao RNA viral; o gene NS, o qual codifica uma fosfoproteína e o gene G, o qual codifica uma glicoproteína responsável pela adsorção do vírus à célula, pela fusão do envelope viral com a membrana plasmática, pela indução de anticorpos neutralizantes e estimulação das células T (Kotait *et al.*, 2009).

Recentemente esses sete genótipos foram divididos em dois filogrupos. O filogrupo I envolve os genótipos 1, 4, 5, 6 e 7 e o filogrupo II, os genótipos 2 e 3. As principais diferenças entre os dois filogrupos estão nas propriedades biológicas como patogenicidade, indução de apoptose e reconhecimento de receptores celulares (Kotait *et al.*, 2009).

Todos os vírus pertencentes ao gênero *Lyssavirus* têm demonstrado ou se espera que possam causar uma encefalite letal, parecida com a raiva, em seres humanos (WHO, 2011).

## **1.4. Epidemiologia**

A raiva é uma doença aguda e progressiva, caracterizada por uma infecção aguda do sistema nervoso central, causada pelo vírus neurotrópico de genoma de RNA. Essa encefalite é, geralmente, de evolução rápida e, na falta de tratamento pós-inoculação (no caso de seres humanos), fatal (Nogueira, 2001; Jackson, 2002; WHO, 2002; Carneiro *et al.*, 2009; Kotait *et al.*, 2009; Aguiar *et al.*, 2011; Brito *et al.*, 2011). Quando não tratada a morte ocorre, geralmente, de 5 a 7 dias após a instalação dos sintomas (Willoughby *et al.*, 2005).

Acomete todos os mamíferos, sendo que carnívoros e quirópteros são os principais hospedeiros.



É uma antroponose cujo agente etiológico é o vírus rábico e se mantém na natureza principalmente por dois ciclos: o urbano, endêmico na maior parte do Brasil, onde o vetor mais comum é o cão; e o ciclo silvestre, onde o principal vetor é o morcego (Ministério da Saúde, 2005; Teixeira *et al.*, 2005; Albas *et al.*, 2011). No entanto, além desses dois ciclos existem também o ciclo aéreo e o ciclo rural, como mostrado na figura 2.

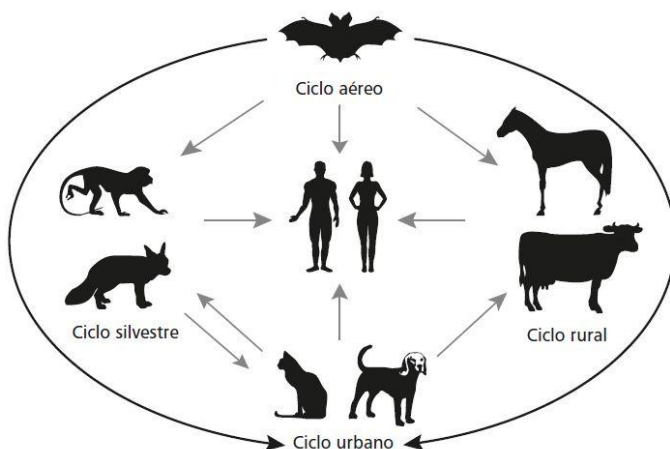


Figura 2: Ciclos epidemiológicos da Raiva

Fonte: Ministério da Saúde: Guia de vigilância epidemiológica, 6ª edição. 2005

O ciclo urbano da raiva é o mais estudado e tem como principais vetores cães e gatos. A infecção de humanos ocorre principalmente pela estreita relação entre homem e animais domésticos.

As variantes virais mais comuns neste tipo de infecção são as variantes caninas. O ciclo urbano causa um grande problema de saúde

pública, sendo responsável por cerca de 55.00 óbitos por ano em todo o mundo (WHO, 2002; Kotait *et al.*, 2009).

Não somente no Brasil, mas globalmente, o cão representa o principal reservatório do vírus, sendo que mais de 2,5 bilhões de pessoas vivem em regiões onde a raiva é endêmica, como mostrado na figura 3 (WHO, 2002).

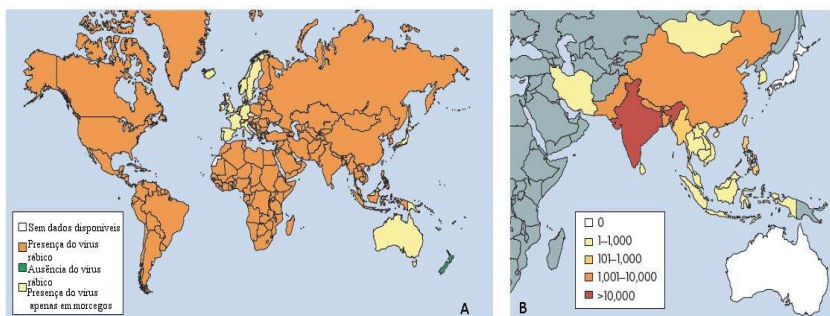


Figura 3: A) Distribuição mundial do vírus da raiva; B) Número de mortes de seres humanos em 2004 (Schnell *et al.*, 2011).

No ciclo rural o principal vetor é o morcego hematófago *Desmodus rotundus* e tem como característica a transmissão da doença à animais domésticos de interesse econômico, como bovídeos, equídeos, caprinos, ovinos e suínos (Kotait *et al.*, 2009).

O ciclo aéreo se caracteriza pela transmissão entre morcegos, sendo eles hematófagos ou não, salientando que todas as espécies são susceptíveis à doença (Kotait *et al.*, 2009).

O ciclo silvestre da raiva acomete diversas espécies diferentes e envolve distintas variantes antigênicas e genéticas. A doença afeta

principalmente espécies da ordem Carnívora, sendo os principais reservatórios chacais, raposas, coiotes, gambás, macacos, entre outros (Kotait *et al.*, 2009).

Em algumas regiões como América do Norte, partes da Europa, Japão e Austrália, devido às medidas de controle e prevenção da doença, o ciclo urbano da raiva está bem controlado ou aparentemente eliminado, sendo o maior problema dessas regiões, o ciclo silvestre da doença (WHO, 2002; Chávez, 2005).

Na Europa os programas de vacinação oral de raposas, que acontece há cerca de 20 anos, reduz a cada ano o número de casos relatados da doença em animais silvestres. O número caiu de 20.000 animais infectados para aproximadamente 6.000 (WHO, 2002).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, embora a doença seja subnotificada, estima-se que haja em torno de 55.000 casos de mortes por raiva, em humanos, por ano, a maioria dos casos sendo na África e Ásia e que pelo menos 10 milhões de pessoas recebem o tratamento pós-exposição contra a doença. África, Ásia e América do sul somam 99% dos casos anuais de raiva humana, e somente na Índia e África são reportados em torno de 30.000 e 24.00 casos anualmente, respectivamente (Hayman *et al.*, 2011).

A raiva se desenvolve de forma semelhante em todos os mamíferos. Primeiramente o vírus se replica no local de inoculação, geralmente tecido muscular e sub-epitelial, até que atinja uma concentração grande o suficiente para alcançar terminações nervosas. Essa é a fase de incubação do vírus e é bastante variável entre espécies de animais, podendo ser bastante longo, diferentemente de outras infecções virais, conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1: Período de incubação médio do vírus rábico em algumas espécies de mamíferos.

Espécie	Período de incubação
Humana	2-8 semanas
Canina	40-120 dias
Herbívoros	25 dias – 3 meses
Quirópteros	muito prolongado

Fonte: Manual técnico do Instituto Pasteur. Raiva – Aspectos gerais e clínica.

Em geral, o tempo de incubação está relacionado com a proximidade do local de entrada do vírus ao sistema nervoso central e também à quantidade da carga viral. Em humanos, a incubação pode variar de extremos como 4 dias a vários anos, porém o tempo médio de incubação gira em torno de 20 a 90 dias (WHO, 2002; Ministério da Saúde, 2005).

O período de transmissibilidade é também extremamente variável entre espécies, porém em todos os animais, abrange o período que precede o aparecimento dos sintomas, durante o seu quadro clínico e perdura até a morte do animal.

Em humanos, os principais sintomas da doença são febre e dor ou parestesia no local de inoculação do vírus e à medida que o vírus migra para o sistema nervoso central, se desenvolve uma encefalite (WHO, 2002).

Durante o curso da doença há duas fases de evolução. A fase prodrômica ocorre assim que a doença se instala e é caracterizada por sintomas inespecíficos, como: febre, dores de cabeça e pelo corpo, parestesia do local de entrada do vírus, mal estar generalizado,

desorientação, náuseas, vômito e dor de garganta (Ministério da Saúde, 2005; Kotait *et al.*, 2009).

Em seguida, o paciente entra na fase neurológica aguda, em que começa a apresentar os sintomas neurológicos da doença, como: ansiedade, nervosismo, insônia, agitação, agressividade e depressão. O paciente começa a apresentar também fobias como hidrofobia, aerofobia e fotofobia, quadro de convulsões, hiperventilação, falta de coordenação e rigidez da nuca (Ministério da Saúde, 2005; Kotait *et al.*, 2009).

O quadro se agrava até o coma do paciente seguido de sua morte.

### **1.5. Transmissão**

A doença é transmitida, principalmente, pela mordedura e arranhadura, podendo ocorrer também pela lambadura de pele lesada ou mucosa, por animais infectados pelo vírus, pois o mesmo se deposita nas glândulas salivares do animal doente (WHO, 2002; Carneiro *et al.*, 2009; Aguiar *et al.*, 2011).

O vírus se liga a receptores localizados no tecido muscular, porém no decorrer da infecção ele é neurotrópico e atinge o sistema nervoso central (SNC) através dos nervos. Em nervos periféricos, a infecção se restringe ao local de contaminação, como mostrado no experimento de Bijlenga & Heaney, em que cortando segmentos de nervos ou o tratamento do nervo com colchicina ou vinblastina acima do local de inoculação, geralmente previne o espalhamento da doença. Esse experimento corrobora a ideia de que o deslocamento do vírus rábico, após a inoculação, segue o fluxo axonal do nervo periférico mais próximo até o sistema nervoso central, o que é uma importante característica patogênica da doença (Bijlenga & Heaney., 1978; Lycke & Tsiang, 1987; Coulon *et al.*, 1989; WHO, 2002).

Coulon e colaboradores mostraram em seu experimento, no ano de 1989 que a infecção viral da cepa CVS geralmente não ocorria em

neurônios adjacentes, o que indica que a infecção não ocorre de um corpo celular para o outro. O material viral foi encontrado em abundância em axônios de nervos sensoriais, o que sugere que os receptores para o vírus estão em terminações nervosas.

Os receptores para o vírus rábico se localizam principalmente em células nervosas e musculares e a mortalidade da doença está associada à intensa replicação viral no sistema nervoso central (Consales *et al.*, 1989).

Vários estudos mostram que, aparentemente, a multiplicação local do vírus em miócitos, após a inoculação, precede o surgimento de material viral no sistema nervoso e que o vírus migra em sentido centrípeto a partir do local da mordida em direção ao sistema nervoso central (Charlton *et al.*, 1979; Coulon *et al.*, 1989; Bronnert *et al.*, 2007).

Charlton e colaboradores observaram que em experimentos com camundongos, nos quais o vírus foi inoculado via intramuscular, as fibras musculares apresentaram imunofluorescência após um tempo menor de incubação em relação ao sistema nervoso central, sugerindo que a replicação viral em miócitos pode estar envolvida no deslocamento do vírus para nervos periféricos.

A partir da ligação da glicoproteína do envelope viral aos receptores nicotínicos da acetilcolina nas células das junções neuromusculares, o vírus segue em direção ao sistema nervoso central, onde se propaga de forma passiva (Jackson, 2008; Kotait *et al.*, 2009).

Após a mordida do animal, a saliva contendo o vírus se deposita nos músculos e em tecidos subcutâneos.

O vírus permanece no local de exposição durante grande parte do tempo de incubação, o qual pode variar de 20 a 90 dias.

Após o período de incubação, o vírus se espalha para o sistema nervoso central, a partir dos nervos periféricos, por transporte axonal.

Pelo sistema nervoso central a disseminação também ocorre pelos axônios. O vírus infecta neurônios em diversas regiões e causa grandes mudanças devido às reações inflamatórias, porém em casos de infecções naturais, poucas mudanças degenerativas e poucas mortes neuronais são observadas (Jackson, 2008; Jackson, 2011).

Após atravessar a junção neuromuscular o vírus se espalha rapidamente por entre axônios em nervos periféricos por transporte axonal retrógrado. Uma vez que o vírus atinge o sistema nervoso central ele se dissemina pelos axônios (Jackson, 2008; Kotait *et al.*, 2009).

Pelo seu grande neurotropismo, o vírus fica protegido do sistema imune do seu hospedeiro, assim que entra nas células nervosas devido à presença da bainha de mielina. Por isso, durante a propagação do vírus através dos nervos não há a produção de anticorpos anti-rábicos para impedir sua chegada ao sistema nervoso central (Kotait *et al.*, 2009).

O vírus passa por um período de intensa replicação de seu genoma no SNC e a partir dele se espalha para múltiplos órgãos através dos sistemas nervosos autônomo e periférico, se concentrando, principalmente em glândulas salivares e como consequência o vírus é eliminado pela saliva de animais infectados, como mostrado na figura 4. O vírus de concentra também em nervos próximos aos folículos pilosos, razão pela qual a biópsia de pele é utilizada como um dos diagnósticos para a raiva em seres humanos, já que nessa região se encontram antígenos virais (Jackson, 2008; Kotait *et al.*, 2009).

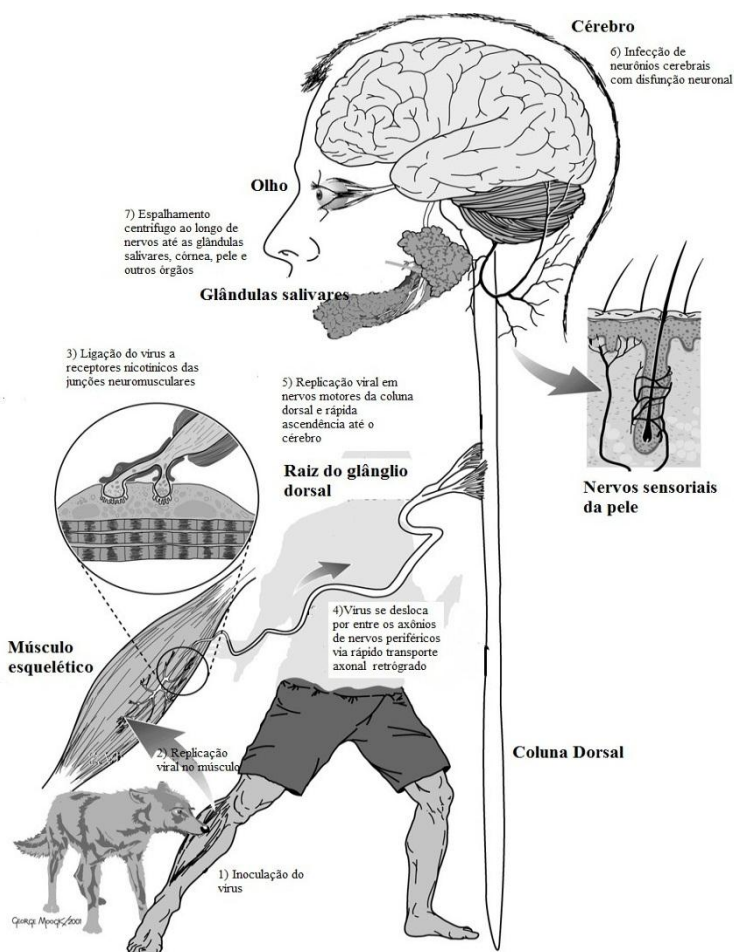




Figura 4: Esquema da sequência de passos na infecção com o vírus rábico após a mordida de um animal raivoso (Jackson, 2008).

Os locais mais comuns de instalação do vírus são o hipocampo, tronco cerebral, células de Purkinje e os sintomas estão relacionados com o local de instalação do vírus no SNC (Kotait *et al.*, 2009).

A grave doença neurológica associada com ausência de mudanças morfológicas na maioria dos neurônios infectados pelo vírus fortalece a ideia de que a doença causa uma disfunção neuronal, contudo a anormalidade fundamental que explica essa disfunção permanece uma incógnita apesar dos muitos estudos experimentais (Jackson, 2008; Jackson, 2011).

Embora a transmissão percutânea seja a mais frequente forma de infecção pelo vírus, há casos registrados de outras formas de transmissão, como por exemplo: via respiratória, pela inalação de aerossóis contendo o vírus; zoofilia; inter-humana; transplante de órgãos; via transplacentária e transmamária e manipulação de carne ou carcaças contaminadas (Kotait *et al.*, 2009).

No ano de 2004 foram relatados sete casos de morte por raiva por transplante de órgãos. A transmissão da doença ocorreu por dois doadores de órgãos, sendo quatro casos nos Estados Unidos e três na Alemanha. Os órgãos doados foram rins, fígado, pulmões e artéria ilíaca, mostrando que o vírus se instala também em órgãos, em pequenos nervos e artérias. Receptores de órgãos encontram-se imunossuprimidos para prevenir a rejeição de órgãos, essa situação compromete suas defesas imunológicas e cria um ambiente favorável para a replicação viral (Bronnert *et al.*, 2007; Jackson, 2008).

## **1.6. Diagnóstico**

O diagnóstico da doença, quando feito através da clínica, bem como por dados epidemiológicos, não é conclusivo, pois os sintomas podem ser comuns a outras doenças, distúrbios genéticos, nutricionais e

toxicológicos, e também pode variar entre espécies de animais e até mesmo entre indivíduos da mesma espécie (Kotait *et al.*, 2009).

O diagnóstico do paciente em vida pode ser confirmado por técnicas de imunofluorescência direta em impressão de córnea, raspado de mucosa lingual, tecido bulbar de folículo piloso ou através de biópsias de pele da região cervical. Entretanto essas técnicas possuem sensibilidade limitada e um resultado negativo nem sempre exclui a possibilidade de infecção, por isso a realização de autópsia é fundamental para a confirmação da doença (Ministério da Saúde, 2005).

No Brasil, as investigações epidemiológicas e diagnósticos laboratoriais são essenciais para guiar as medidas a serem implementadas como parte do Programa Nacional de Controle da Raiva Humana do Ministério da Saúde Brasileiro (Brito *et al.*, 2011).

Além do diagnóstico clínico, há também, o diagnóstico laboratorial, entretanto este é realizado somente após a morte do animal e consiste em um teste de imunofluorescência direta de tecido nervoso, realizada pela impressão de tecido em lâmina de microscopia ou pela investigação de antígenos do vírus da raiva em cultura celular (Kotait *et al.*, 2009).

Atualmente não existem diagnósticos confiáveis para a detecção da raiva humana antes da instalação dos sintomas. Ademais, pelo fato do vírus ser um parasita intracelular obrigatório, provavelmente em miócitos e neurônios periféricos ao local de infecção, ele estaria imunologicamente protegido, de difícil detecção e somente estimularia a produção de anticorpos mais tardiamente na infecção. Por ele estar protegido da resposta imune do hospedeiro, esta é usualmente lenta e há uma demora na produção anticorpos contra as proteínas G e N do vírus. O número de células *natural killer* é também, geralmente, reduzido, implicando em um déficit do reconhecimento e ativação do sistema imune (WHO, 2002).

Esse é o motivo pelo qual, qualquer caso em que haja a suspeita de infecção pelo vírus, o tratamento profilático pós-exposição deve ser iniciado o mais rapidamente possível, para que o vírus não atinja o sistema nervoso central e para que os sintomas clínicos não se manifestem (WHO, 2002).

### **1.7. Profilaxia**

Existem dois tipos de tratamento para a profilaxia da raiva humana. O tratamento pré-exposição é recomendado pelo Programa Nacional de Controle da Raiva Humana do Ministério da Saúde Brasileiro e é aplicado em profissionais expostos ao vírus, como veterinários e biólogos, de maneira profilática (Brito *et al.*, 2011). Há, também, o tratamento pós-exposição, aplicado em pessoas que entraram em contato com animais suspeitos de estarem infectados com o vírus rábico.

O tratamento pós-inoculação consiste em vacinação e em casos mais severos, imunoterapia com imunoglobulinas humanas ou equinas (Lockhart *et al.*, 1992). Este é realizado apenas em seres humanos, pois em animais há a recomendação, de que quando se suspeita da doença, o mesmo seja sacrificado (Chávez, 2005).

Imunoglobulinas humanas ou equinas e aplicação de vacina anti-rábica são as formas de tratamento pós-exposição hoje existentes, porém essas medidas não são eficazes após a instalação dos sintomas da doença. Isso por que uma vez diagnosticada a encefalite aguda causada pelo vírus da raiva, não há muito que se fazer e quase na totalidade dos casos, culmina na morte do paciente (Chávez, 2005).

Desde 1967 a vacina anti-rábica produzida em cultura celular de célula diplóide de humanos é utilizada e é até hoje considerada como uma vacina padrão-ouro. As vacinas produzidas em culturas celulares são utilizadas tanto para tratamento pós quanto pré-exposição, sendo aplicada para a proteção de pessoas que podem manter contato com o

vírus, principalmente em seu local de trabalho. Dentre as reações adversas à vacina anti-rábica relatadas, podem-se citar dores de cabeça, náusea, dores abdominais, edema alérgico e febre (WHO, 2002).

Entretanto, mais recentemente foram desenvolvidas novas vacinas, uma produzida em embrião de aves purificado e a outra produzida em células *Vero*. Essas vacinas são mais baratas e possuem eficácia comparável à vacina produzida em células diplóides humanas (WHO, 2002).

Os tratamentos de pós-exposição para a prevenção da raiva humana utilizando uma combinação de vacinação e imunoglobulinas e eliminação de cães contribuíram muito para a redução do número de casos de raiva humana em países como China, Indonésia, Tailândia e Vietnã, entretanto, 6 milhões de pessoas, por ano, ainda precisam receber tratamentos pós-exposição, a grande maioria na China e Índia (WHO, 2002).

O tratamento pós-exposição quando iniciado antes da instalação dos sintomas, preferencialmente logo após o contato com o vírus é bastante eficaz, evitando a morte do paciente em aproximadamente 100% dos casos (WHO, 2002).

Em vários países, vacinas anti-rábicas de uso veterinário são aplicadas para a imunização de animais domésticos e em países industrializados, vacinas orais são utilizadas para a imunização de animais selvagens. No entanto as tentativas de controle da raiva em animais nas regiões mais pobres têm sido falhas.

Os esquemas de tratamento pós-exposição representam os maiores custos no tratamento da raiva. Nesses custos estão inclusos o tipo e regime de vacinação, sua via de administração bem como o tipo de imunoglobulina utilizado (WHO, 2005).

Na Ásia e África, os custos giram em torno de US\$ 583,5 milhões por ano, nos Estados Unidos e Brasil, esses valores são,

aproximadamente, US\$ 300 milhões e US\$ 28 milhões, respectivamente. Nessas despesas estão inclusos vacinações para humanos e animais, imunoglobulinas, diagnósticos laboratoriais, profissionais médicos e veterinários e profissionais treinados para realizarem vacinação em campanhas. Mundialmente os gastos se aproximam de US\$ 1 bilhão por ano, porém esse valor é bastante subestimado pela falta de vigilância e de baixo número de casos reportados (WHO, 2005).

Atualmente não há nenhum tratamento específico para o tratamento da doença após o aparecimento dos sintomas (Jackson, 2009).

Na literatura há apenas dois casos descritos de pacientes que se obtiveram a cura da infecção após a instalação dos sintomas.

No primeiro caso descrito no ano de 2004, uma jovem de 15 anos foi infectada pelo vírus e não recebeu nenhum tratamento pós-exposição (Bronnert *et al.*, 2007). Os sintomas da doença surgiram após um mês do contato com o vírus rábico, o qual ocorreu pelo contato com um morcego.

Essa paciente sobreviveu, quase sem sequelas e seu tratamento baseou-se em dois princípios, o primeiro foi a indução do coma, pela utilização de agentes anti-excitatórios como a cetamina, a qual é um anestésico, midazolam, o qual é um agente ansiolítico, anticonvulsivante e miorrelaxante e fenobarbitúricos, os quais são drogas antiepiléticas (Jackson, 2009; Kotait *et al.*, 2009).

Porém o sucesso do tratamento pode ter sido devido à variante viral a qual poderia ter algumas propriedades biológicas atenuadas, já que em outros casos em que o mesmo tratamento foi utilizado o sucesso não foi alcançado (Jackson, 2009). Além disso, a terapia de indução do coma não é recomendada, pois não possui comprovação nem evidências científicas de eficácia, por não se saber a real necessidade do paciente estar em estado de coma para a aplicação da terapia anti-rábica e por que

a indução do coma não é uma terapia benigna, podendo trazer sérios efeitos adversos ao paciente (Jackson, 2009; Jackson, 2011).

O segundo princípio foi a utilização de medicamentos antivirais, como a ribavirina, uma droga antiviral de largo espectro contra vírus de RNA, a qual interfere com a transcrição viral e é capaz de prevenir a replicação viral e amantadina a qual age inibindo a liberação do ácido nucleico viral no citoplasma (Kotait *et al.*, 2009). Porém nenhum desses dois medicamentos é específico para a inibição do vírus rábico.

### **1.8. Drogas antivirais**

Todos os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios e por essa razão até a década de 1950 acreditava-se que não houvesse a possibilidade de terapia. A partir da descoberta do fármaco Idoxurina, a primeira droga antiviral a ser vastamente utilizada por ter utilidade clínica comprovada para o tratamento tópico de herpes, esse dogma foi revertido (De Clercq & Field, 2006).

Um dos primeiros fármacos antivirais desenvolvido para o tratamento do HIV foi o AZT (azidotimidina). Esse medicamento está longe de ser ideal para o tratamento da infecção, porém com ele muitas oportunidades surgiram para a pesquisa de novos compostos com maiores potenciais e segurança, e assim criando novos alvos e opções para a terapia da doença (De Clercq, 2010).

No ano de 2008, 25 anos após a descoberta do vírus HIV, chegou-se ao número de 25 compostos oficialmente aprovados para o tratamento da AIDS (De Clercq, 2010).

Atualmente, após 50 anos da descrição da primeira droga com ação antiviral, existem aproximadamente 50 compostos antivirais aprovados pelo US-FDA (*Food and Drugs Administration*). Metade desses compostos é utilizada no tratamento de pacientes infectados pelo vírus HIV, os outros são utilizados no tratamento de *Herpes simplex*

*virus* (HSV), *Varicela-zoster virus* (VZV), citomegalovírus, vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV) e vírus Influenza A (De Clercq, 2004; De Clercq & Field, 2006; De Clercq, 2010).

Apesar de várias vacinas contra agentes virais terem sido desenvolvidas, seu uso não é o suficiente para a eliminação das doenças causadas por esses vírus e drogas antivirais são necessárias para o tratamento das mesmas (De Clercq, 2002).

A maioria das drogas antivirais hoje utilizadas no tratamento de infecções virais foi aprovada nos últimos 10 anos, sendo a maioria delas utilizadas para infecções por HIV (De Clercq, 2004). Contudo, ainda há uma grande necessidade de desenvolvimento de novas drogas já que a resistência viral às drogas e efeitos adversos destas são as grandes razões para um maior refinamento no desenvolvimento de novos compostos, para a obtenção de drogas produzidas por compostos menos tóxicos ao organismo, com um maior espectro de ação e com menores chances de desenvolvimento de resistência viral (De Clercq, 2002).

Para que um composto seja aprovado para a sua utilização em medicamentos os seguintes pontos devem ser estudados: sua estrutura química, espectro de atividade, mecanismo de ação, indicação clínica, via de administração e dosagem. Outros pontos que necessitam ser analisados são a duração do tratamento, quantas drogas serão utilizadas na terapia, sua farmacocinética (biodisponibilidade, distribuição no organismo, metabolismo hepático e excreção), interações com outras drogas, efeitos tóxicos e o desenvolvimento de resistência ao fármaco (De Clercq, 2004).

A pesquisa de novos compostos antivirais é importante para se encontrar tratamentos alternativos para infecções virais, principalmente por causa de reações adversas que vacinas podem causar, como por exemplo, em casos de alergias ou outras complicações, no caso da utilização de soros.

No caso específico do vírus rábico, a única forma de profilaxia pós-exposição existente é a aplicação de vacina anti-rábica concomitante com a aplicação de soro anti-rábico.

Por não existir nenhum medicamento antiviral específico contra o vírus rábico e sendo o tratamento pela a vacinação e aplicação de soro eficaz apenas se for administrado antes da instalação dos sintomas, a cura da raiva após a instalação da doença é bastante rara, sendo descritos apenas dois casos na literatura (Kotait et al., 2009).

As imunoglobulinas humanas e equinas tem sua distribuição mundial em quantidade limitada, devido ao seu alto valor. Por esse motivo é altamente necessária a descoberta de soluções alternativas para a fase inicial do tratamento contra o vírus rábico (Real et al., 2004).

O tratamento local com um agente virucida poderia ser a solução para este problema, por essa razão, o desenvolvimento de um medicamento antiviral para o tratamento da raiva é de grande importância (Real et al., 2004).

## **1.9. O Gênero *Ganoderma***

O gênero *Ganoderma* tem grande importância e tem sido utilizado há mais de dois milênios na medicina tradicional da China e do Japão para o tratamento de diversas doenças humanas, tais como hepatopatias, nefrites, hipertensão, hiperlipemia, artrites, diabetes, anorexia, asma, bronquite, úlceras gástricas e neoplasias. Acredita-se que seu consumo regular tenha efeitos positivos na vitalidade e longevidade (Eo et al., 1999; Junior et al., 1999; Boh et al., 2000; Gerber et al., 2000; Smânia et al., 2003; Liu et al., 2004; Paterson, 2006; Yang et al., 2007).

Dentre as pesquisas realizadas com esses fungos destacam-se as que investigam suas atividades biológicas como antialérgicos, imunomoduladores, imunossupressores e imunoestimuladores, também



no tratamento de HIV, antitumorais, e proteção e desintoxicação hepática (Boh *et al.*, 2000).

Dentre as mais de 250 espécies deste gênero, se destacam *Ganoderma lucidum* e *Ganoderma applanatum*. Isso por que o gênero *Ganoderma* pode ser dividido em dois grupos, por suas características macroscópicas. São eles: O complexo *G. lucidum*, o qual compreende as espécies que possuem a superfície do píleo lacada, e o complexo *G. applanatum*, o qual compreende espécies com a superfície do píleo não lacada (Gerber *et al.*, 2000; Smânia *et al.*, 2007).

A espécie mais estudada atualmente deste gênero é *Ganoderma lucidum* devido ao seu grande interesse comercial e medicinal. Dela podem ser extraídos mais 119 triterpenóides, sendo que muitos deles apresentam atividades biológicas já descritas (Junior *et al.*, 1999; Gerber *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2004; Smânia *et al.*, 2007).

De *G. lucidum* podem ser extraídos compostos como os ácidos ganodérmicos B e C, os quais inibem a liberação de histamina por mastócitos, bem como, o crescimento de células tumorais do fígado (Eo *et al.*, 1999 ).

A administração oral de *G. lucidum* parece ser bastante segura, já que seu extrato não apresenta toxicidade.

Algumas das pesquisas já realizadas mostram que em sua atividade anti-herpética, *G. lucidum* é um potente promissor. Outras pesquisas demonstram que *G. lucidum* pode induzir apoptose, inibir a proliferação celular e suprimir a migração de células PC-3, um tipo bastante invasivo de câncer de próstata. Entretanto, o mecanismo molecular envolvido e responsável pelos seus efeitos inibitórios ainda não foram elucidados (Liu *et al.*, 2004; Paterson, 2006).

Polissacarídeos extraídos de *G. lucidum* também podem apresentar atividades biológicas, como atividade antitumoral contra sarcoma 180 em camundongos, e quando combinados com drogas

antitumorais, apresentam efeitos aditivos ou até mesmo sinérgicos (Junior *et al.*, 1999).

O fungo *Ganoderma applanatum*, também bastante utilizado em estudos científicos, apresenta atividades antitumoral, antibiótica, antiviral, bem como alguma atividade imunológica (Yang *et al.*, 2007).

Diversos grupos de compostos podem ser extraídos de *Ganoderma* spp., sendo eles isolados principalmente do micélio e corpo frutífero. Os principais compostos extraídos são triterpenóides, polissacarídeos, proteínas, esteroides e enzimas. Os efeitos de importância farmacêutica são atribuídos principalmente aos polissacarídeos e triterpenóides (Boh *et al.*, 2000; Gerber *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2004).

Nesse gênero são encontrados mais de 100 triterpenos, como ácidos aplanoxídicos, ácidos ganodérmicos, sendo que a maioria dos triterpenos isolados de *Ganoderma* spp. não são encontrados em outros gêneros. Os triterpenos são considerados como potenciais agentes antitumorais, devido a sua atividade na inibição do crescimento celular de tumores, além de sua citotoxicidade contra células tumorais. Triterpenos possuem também atividade contra proteases do vírus HIV-1 e HIV-2 (Boh *et al.*, 2000; Gerber *et al.*, 2000; Paterson, 2006).

Possuem também atividade anti-hepatotóxica, anti-hipertensiva, anti-histamínica e hipocolesterolêmico. Alguns estudos mostram também que os triterpenos isolados de *Ganoderma* spp. apresentam atividade antioxidativa, de hepatoproteção e no controle da hipertensão (Boh *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2004).

Os esteróis GA1 e GA2, também extraídos de *Ganoderma* spp., assim como os ácidos aplanoxídicos A, C, F e G demonstraram possuir atividade antifúngica contra *Microsporum canis* e *Trichophyton mentagrophytes*, agindo na inibição de crescimento, em concentrações de 500 a 1000 µg/ml (Smânia *et al.*, 2003).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos Gerais**

Esse trabalho tem como objetivo realizar triagem *in vitro* de 9 compostos naturais extraídos de fungos do gênero *Ganoderma* para identificar potenciais atividades antivirais em relação ao vírus rábico.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Determinar a citotoxicidade dos compostos estudados através do ensaio de redução do sal de tetrazólio (MTT);
- Realizar a triagem de compostos com potencial ação antiviral através da observação da redução de efeito citopático do vírus sobre células da linhagem McCoy.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Linhagem celular**

A linhagem de células utilizada neste trabalho foi a linhagem de células McCoy (ATCC: CRL 1696, USA). São células fibroblásticas obtidas do líquido sinovial de ratos. A escolha desse tipo celular se deu pela sua grande permissividade ao vírus rábico, observado em vários estudos, permitindo sua multiplicação no interior das células e visualização de efeito citopático, reprodutível, e de fácil observação em microscópio óptico invertido (Nogueira, 1998; Chávez, 2005).

O efeito citopático observado nessa linhagem celular consiste no aumento significativo do tamanho das células e ruptura do padrão clássico da monocamada celular em cultura. Esse aumento deve à replicação viral no interior da célula (Nogueira, 1998).

#### **3.2. Meio de cultura celular e reagentes**

O meio de cultura utilizado foi o meio DMEM-F12 (Cultilab), o qual é recomendado para a manutenção de células fibroblásticas. Ao meio de cultura são acrescentados 0,014Mol/l de bicarbonato de sódio, soro bovino fetal (SBF; Cultilab), para a promoção do crescimento e manutenção da linhagem celular, na proporção de 10ml para cada 100ml de meio de cultura. Ao meio é acrescentado 1ml de uma solução de antibióticos e antifúngicos (10.000U de penicilina G, 10.000µg de estreptomicina, 25µg de anfotericina B – Gibco/BRL; Sigma-Aldrich) (PSA) para cada 100mL de meio.

Para a obtenção de subculturas, manutenção celular e realização de experimentos foi utilizada a enzima proteolítica tripsina a 0,25%, para descolamento das células do suporte plástico.

#### **3.3. Cultivo e manutenção celular**

As células McCoy são cultivadas em garrafas de cultura celular de 25 cm<sup>2</sup>. As subculturas são obtidas do seguinte modo:

O meio contido na garrafa é descartado e o tapete celular é lavado com uma solução tampão salina fosfato (PBS) estéril. Após a lavagem com PBS, é adicionada à garrafa 1ml de solução tripsina a 0,25% para que a monocamada de células se desprenda do fundo da garrafa, durante cinco minutos.

Após tripsinização são acrescentados 10ml de meio de cultura DMEM-F12, suplementado com 10% de SBF e 1% de PSA para que a tripsina seja inativada, já que a mesma é prejudicial à célula. Com uma pipeta são desfeitos os grumos celulares formados e então, 1ml da suspensão dessa é transferido para uma nova garrafa.

As culturas celulares são mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.4. Cepa viral**

Foi utilizada neste trabalho a cepa de vírus rábico *Challenge Virus Standart* (CVS). Esta cepa é mantida a partir de uma solução-estoque no Laboratório de Imunologia Aplicada - LIA - da Universidade Federal de Santa Catarina e foi gentilmente cedida pelo Instituto Pasteur de São Paulo. Essa cepa é bastante utilizada em experimentos laboratoriais e é denominada cepa de “vírus fixo”.

### **3.5. Produção viral**

Para a realização deste trabalho foram utilizados dois estoques virais, denominados estoque-viral A e estoque-viral B.

O estoque-viral B foi produzido a partir de alíquotas pré-existentes do estoque-viral A, em células BHK-21 do seguinte modo:

De uma cultura celular de células da linhagem celular BHK-21 foram transferidos, para uma garrafa de cultura celular de 25cm<sup>2</sup>, 3ml de suspensão celular com aproximadamente  $1 \times 10^4$  células/ml. Em seguida foram adicionados 2ml de suspensão viral do estoque-viral A.

A garrafa contendo células + vírus foi colocada em banho-maria a 37° C para a adsorção viral durante 60 minutos, sendo que a garrafa foi levemente agitada entre períodos regulares de 5 minutos para evitar a adesão celular.

Após os 60 minutos a suspensão células + vírus foi igualmente distribuída em duas novas garrafas de cultura de 25cm<sup>2</sup>, cada uma contendo 10ml de meio de cultura DMEN-F12.

As garrafas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> durante 96 horas, até que se pudesse observar, em microscópio invertido, o descolamento das células do fundo das garrafas. A cada 24 horas o pH das garrafas foi regulado com 10µl de solução NaOH a 1N, para se evitar a inativação viral.

Após 96 horas o conteúdo das garrafas foi centrifugado a 1500 rpm durante 10 minutos, alíquotado e conservado em *freezer* a -80°C.

### **3.6. Determinação do título viral a partir da visualização de efeito citopático**

A determinação do título viral é de suma importância nesse experimento para se avaliar, posteriormente, a atividade antiviral. Consiste em se determinar qual a diluição viral, capaz de infectar células permissivas, será utilizada nos experimentos, para a triagem de compostos.

Esse experimento foi realizado pelo método de diluições limitantes e a estimativa de 50% de infecção (ID<sub>50</sub>) foi realizada visualmente (Chávez, 2005). Resumidamente, em uma microplaca de 96 cavidades foram utilizadas duas linhas (1 e 12) com 8 cavidades cada para controle celular. Nesses poços foram adicionados 100µl de meio DMEM-F12, suplementado com 5% de SBF e 1% de solução PSA, e 100µl de suspensão celular contendo, aproximadamente, 2,5x10<sup>5</sup> células/ml, contadas em câmara de Neubauer.

Na linha 2 foram adicionados 200µl de suspensão do estoque-viral.

Nas linhas 3-11, foram feitas diluições seriadas de razão de 1:2, como mostra a figura 5.

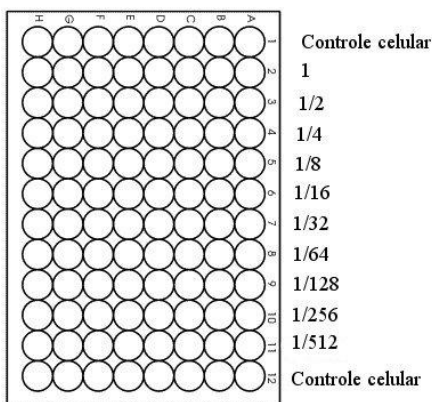


Figura 5: Esquema de diluições para a determinação do título viral.

A placa foi acondicionada em estufa à temperatura de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> e incubada durante 72 horas, sendo que a cada 24 horas, a placa foi observada em microscópio invertido para a verificação de efeito citopático.

Passadas 72 horas a placa foi observada para determinação de efeito citopático.

Todas as cavidades foram observadas e analisadas para a confecção de uma escala de efeito citopático apresentado em cada cavidade.

Foi determinada uma escala de infectividade, em símbolos, como representado na figura 6:

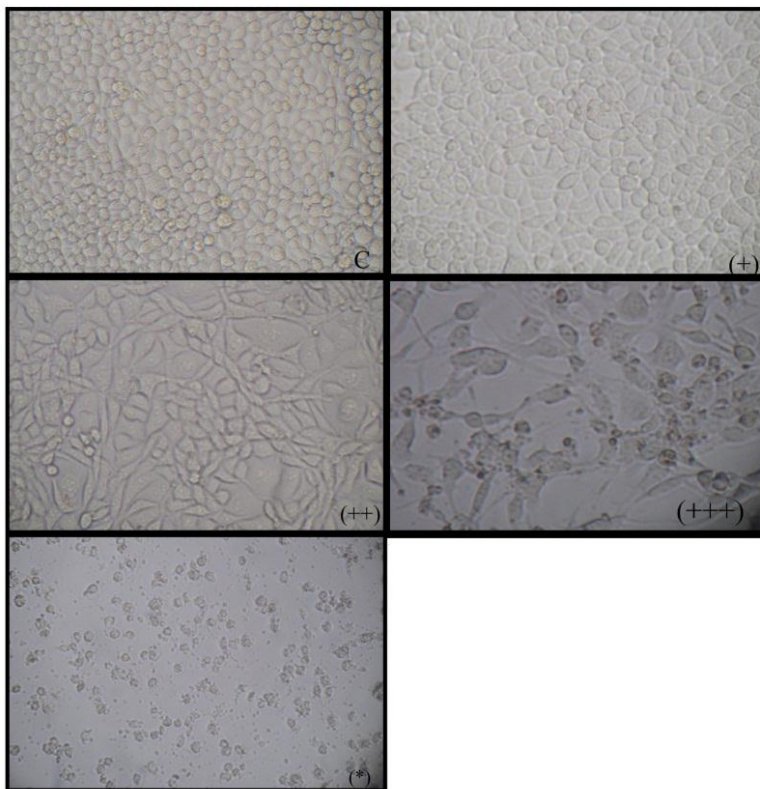


Figura 6: Escala de infecção celular pelo vírus da raiva. C: Controle celular; (+): Células infectadas, porém sem efeito citopático aparente; (++): Tapete celular irregular, células expandidas; (+++): Tapete celular totalmente irregular, células danificadas; (\*): Tapete celular totalmente destruído, todas as células mortas.

### 3.7. Compostos e preparação de soluções-estoque

Os compostos utilizados neste trabalho, gentilmente cedidos pelo professor Artur Smânia, são:

- 1- Extrato de *Ganoderma applanatum*





Figura 7: *Ganoderma applanatum*

Fonte: <http://www.first-nature.com/fungi/ganoderma-applanatum.php>.

2- Extrato de *Ganoderma lucidum*



Figura 8: *Ganoderma lucidum*

Fonte:

[http://www.mushroomthejournal.com/greatlakesdata/Taxa/Ganodlucid143.ht](http://www.mushroomthejournal.com/greatlakesdata/Taxa/Ganodlucid143.html)  
ml.

3- Extrato de *Ganoderma sp.*



Figura 9: *Ganoderma* sp.

Fonte: <http://www.mycology.com/BurkinaFaso/Polypore.htm>.

- 4- Ácido aplanoxídico A
- 5- Ácido aplanoxídico C
- 6- Ácido aplanoxídico F
- 7- Ácido aplanoxídico G

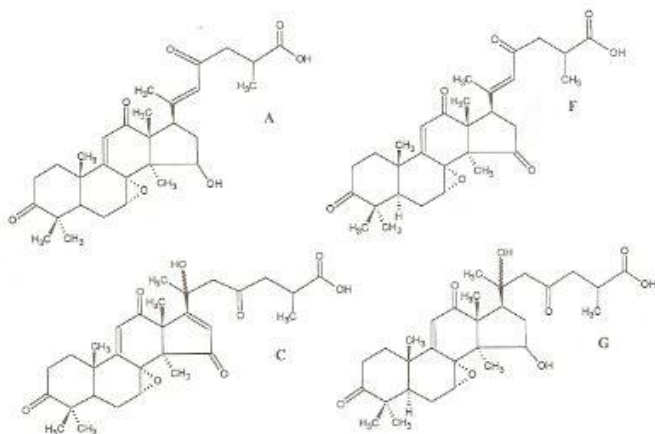


Figura 10: Fórmulas estruturais dos ácidos aplanoxídicos A, C, F e G (Gerber *et al.*,2000).

## 8- GA1

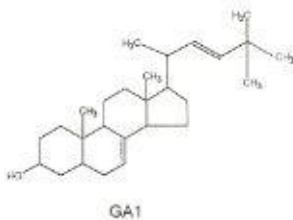


Figura 11: Fórmula estrutural de GA1(Junior *et al.*,1999).

#### 9- GA2

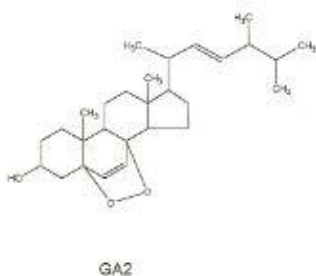


Figura 12: Fórmula estrutural de GA2 (Junior *et al.*,1999).

#### 10- Cetamina

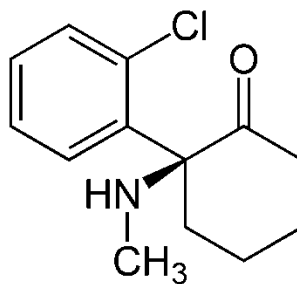
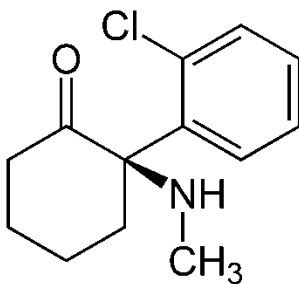


Figura 13: Fórmula estrutural de cetamina.

Fonte:

[http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Ketamine\\_Structural\\_Formulae.png](http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Ketamine_Structural_Formulae.png)

As soluções-estoque dos compostos foram preparadas para que se fossem obtidas soluções na concentração de 1mg/ml.

Os compostos 1, 2, 3 e 8 foram pesados em balança de precisão e diluídos em solução 20% de DMSO e os volumes foram completados com meio DMEM-F12 até que cada solução obtida estivesse na concentração 1mg/ml.

Os compostos 4, 5, 6, 7 e 9 foram pesados em balança de precisão e diluídos em solução 10% DMSO e os volumes foram completados com meio DMEM-F12 até que cada solução obtida estivesse na concentração de 1mg/ml.

O composto 10 foi diluído em meio DMEM-F12 até que o mesmo estivesse na concentração de 1mg/ml.

Todos os compostos foram filtrados em filtro *Milipore*<sup>TM</sup> de 22µm, alíquotados e armazenados em geladeira.

### **3.8. Avaliação da concentração citotóxica (CC<sub>50</sub>) através do ensaio colorimétrico com sal de Tetrazólio (MTT)**

A avaliação da citotoxicidade dos compostos estudados é necessária para se avaliar os possíveis efeitos tóxicos que o composto pode ter sobre as células bem como determinar a concentração em o tal composto passa a ter atividade citotóxica nas células (Takeuchi *et al.*, 1991). A avaliação realizada em diluições seriadas na razão de 3 e a avaliação da potencial ação antiviral dos compostos é feita com diluições maiores do que a diluição que apresenta efeito citotóxico, em níveis de absorbância, de menos de 50% da células, em comparação a um controle celular.

A concentração citotóxica ( $CC_{50}$ ) dos compostos estudados é definida como a concentração que reduz em 50% a absorbância das células submetidas a eles em comparação com um controle celular (Takeuchi *et al.*, 1991).

A avaliação dos compostos foi realizada em placas de 96 cavidades, em esquema de triplicatas, como mostrado na figura 14.

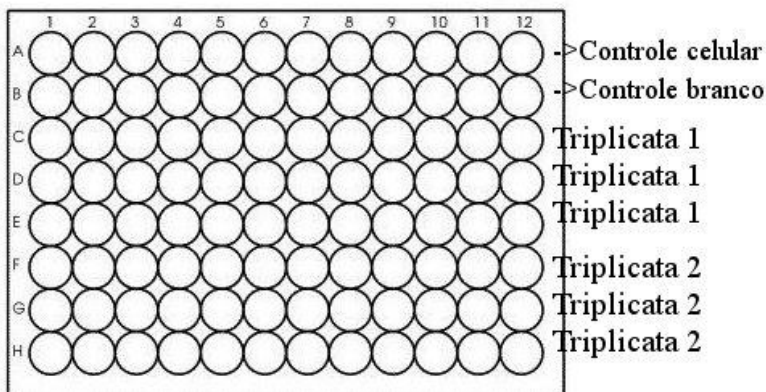


Figura 14: Esquema de diluições para avaliação de citotoxicidade através do ensaio colorimétrico com sal de Tetrazolium (MTT).

Em cada cavidade, exceto no controle branco, foram adicionados 200µl de uma suspensão celular contendo aproximadamente  $2,5 \times 10^5$  células/ml e em seguida as placas foram incubadas em estufa nas condições de 5%  $CO_2$  e 37° C, por 24 horas, para a formação de um tapete celular.

Após 24 horas as placas foram retiradas de incubação e o meio de cultura de cada cavidade foi aspirado e substituído pelo composto a ser avaliado começando por uma concentração de 1mg/ml de composto e diluições crescentes do mesmo na razão de 3.

As placas foram, então, novamente para a incubação, nas condições citadas acima, por 72 horas para que o composto pudesse agir sobre o tapete celular.

Após 72 horas as placas foram retiradas da incubação e as cavidades foram observadas em microscópio invertido para a visualização e avaliação de modificações celulares e, posteriormente, o meio aspirado de cada cavidade, em seguida foram adicionados, a cada cavidade, 50µl de solução MTT diluído em meio de cultura DMEM-F12, em uma concentração de 1mg/ml e as placas foram novamente incubadas por 4 horas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> e 37° C.

O MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)] é um corante amarelo que é metabolizado por células viáveis e reduzido à formazana por enzimas mitocondriais. Formazanas são cristais azuis, insolúveis. Como células mortas não reduzem o MTT à formazana, a quantidade de cristais de formazana presentes podem ser lidos e estimada a quantidade de células viáveis através da absorbância emitida (Takeuchi *et al.*, 1991).

Passadas às 4 horas de incubação, a solução MTT for aspirada de cada cavidade e foram adicionados 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada cavidade, inclusive no controle branco.

As placas foram, então, mantidas sob agitação durante 10 minutos para que os cristais de formazana fossem solubilizados e em seguida, as placas foram lidas em espectofotômetro a 540nm.

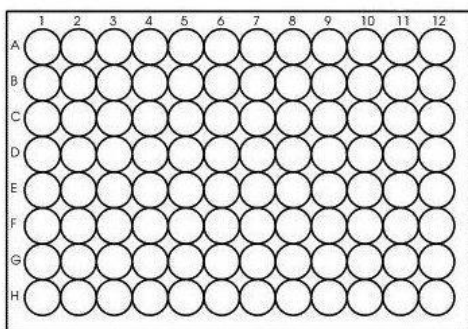
### **3.9. Triagem *in vitro* da potencial ação antiviral dos compostos utilizados, contra o vírus rábico, através da redução do efeito citopático**

Em uma placa de 96 cavidades foram adicionados 60µl de meio DMEN-F12, 50µl dos compostos-teste em diferentes concentrações, iniciando-se na concentração menor do que a CC<sub>50</sub> de cada composto em esquema de triplicatas e 100 µl uma suspensão celular contendo

aproximadamente  $1 \times 10^5$  células/ml, contadas em câmara de Neubauer, em cada cavidade.

Foram adicionados também 100µl de suspensão viral em diluição de 1/2 nos experimentos em que o estoque-viral A foi utilizado e o estoque-viral B puro, nos experimentos em que este foi utilizado.

Foram realizados controles celulares para assegurar a viabilidade das células, controles virais nas diluições 1/2, 1/4, 1/8 e 1/16, em esquema de duplicatas, para garantir a viabilidade viral e a presença de efeito citopático na diluição escolhida para a realização dos testes e controle positivo com cetamina, para a visualização de redução de efeito citopático do vírus rábico. A disposição do experimento nas placas de 96 cavidades é representada na figura 15.



**A-H/ 1-9: Triplicatas de materiais-teste em concentrações decrescentes na razão 1/3 (menores que CC50) + suspensão viral**  
**A-H/10: Controle positivo - cetamina**  
**A-B/11: Controle viral na diluição 1 ou 1/2**  
**C-D/11: Controle viral na diluição 1/4**  
**E-F: Controle viral na diluição 1/8**  
**G-H: Controle viral na diluição 1/16**  
**A-H/12: Controle celular**

Figura 15: Esquema do experimento para a triagem *in vitro* da potencial ação antiviral dos compostos estudados, contra o vírus rábico.



## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Determinação do título viral a partir da visualização de efeito citopático**

As técnicas clássicas para a determinação do título viral rábico são imunofluorescência e inoculação intracerebral em camundongos (Ministério da Saúde, 2005).

Embora bastante sensível, a inoculação intracerebral em camundongos vem sido substituída por outras técnicas que não utilizam animais e que sejam mais práticas e com maior rapidez de resultados (Consales *et al.*, 1989; Chavéz, 2005).

Muitos métodos foram desenvolvidos para a determinação da atividade antiviral em culturas celulares. Certos vírus tem a propriedade de causar efeitos citopáticos em culturas celulares. Para estes, a visualização da inibição do efeito citopático é frequentemente utilizada, por sua rapidez e facilidade de avaliação de um maior número de composto por placa de cultura celular (Smee *et al.*, 2002).

Neste trabalho o título viral utilizado foi determinado através da visualização do efeito citopático. Diferente de outras linhagens celulares, as células McCoy quando infectadas pelo vírus rábico apresentam distorções no padrão do tapete celular entre 24 e 72 horas após a infecção. Essas distorções configuram o efeito citopático causado pelo vírus da raiva (Consales *et al.*, 1989; Nogueira, 1998).

Foram utilizadas duas soluções-estoque de vírus rábico, denominadas estoque-viral A e estoque-viral B. A metodologia aplicada indicou que a melhor diluição viral a ser utilizada neste trabalho para o estoque-viral A é a diluição 1/2, a partir do estoque-viral A e o estoque-viral B foi utilizado na sua forma pura, sem ser diluído em meio DMEN-F12. As diluições foram assim escolhidas, pois desta maneira mostraram efeito citopático bastante claro em todas as células

infectadas, portanto essas diluições foram escolhidas para a realização dos testes para a triagem de potencial atividade antiviral dos compostos.

#### **4.2. Avaliação da citotoxicidade através do ensaio do MTT**

A citotoxicidade de um composto é a sua capacidade de induzir a morte celular. Estudos de citotoxicidade, *in vitro*, são úteis para definir a toxicidade basal de um composto, como por exemplo, sua capacidade de causar danos às células, impedindo suas funções básicas e consequentemente levando-as a morte. É utilizado também para definir concentrações ideais de compostos para a investigação de suas atividades *in vitro*. Pelo estabelecimento das concentrações nas quais 50% das células são afetadas ( $CC_{50}$ ), é possível se comparar quantitativamente a resposta de um composto em sistemas celulares diferentes, ou de diversos compostos em um único sistema celular (Eisenbrand *et al.*, 2002).

A utilização de técnicas laboratoriais que dispensam o uso de animais, como por exemplo, estudos *in vitro*, fornecem ferramentas importantes para o estudo de efeitos danosos de componentes químicos e para prever sua ação em seres humanos (Eisenbrand *et al.*, 2002).

Neste trabalho foi utilizado o ensaio com MTT para a determinação das concentrações de  $CC_{50}$ , dos compostos estudados, a serem utilizadas nos experimentos com a linhagem celular McCoy.

O sal 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT) faz parte de um grupo de compostos orgânicos heterocíclicos, de cor amarela, e que entra nas células por endocitose. No interior das células, se formam cristais de formazana quando o mesmo é reduzido. Esses cristais são insolúveis e de coloração azul escuro (Takeuchi *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1997).

Os cristais de formazana são vastamente utilizados como indicadores de sistemas *redox* biológicos e como indicadores de viabilidade celular. A sua redução é bastante utilizada como método

para medir proliferação celular e em estudos de citotoxicidade, embora seu mecanismo de redução no interior da célula seja pouco compreendido, mesmo assim, muitas evidências apontam para as mitocôndrias como as principais organelas responsáveis pela redução do MTT em células viáveis (Liu *et al.*, 1997).

Entretanto, vários estudos mostram a participação das mitocôndrias na redução do MTT, outros estudos mostram que algumas desidrogenases não mitocondriais também podem participar da redução do MTT (Liu *et al.*, 1997).

Apesar disso, os ensaios que utilizam MTT para medir a viabilidade celular são ainda válidos, pois o MTT não é permeável à membrana lipídica, então, o mesmo entra nas células por endocitose, uma característica importante da maioria das células viáveis (Liu *et al.*, 1997).

Para se avaliar a atividade antiviral de um composto é necessário primeiramente se avaliar a sua toxicidade quando em contato com as células utilizadas. Por isso, é preciso encontrar o ponto em que a sua atividade não se torne tóxica para o objeto de estudo (Takeuchi *et al.*, 1991).

As concentrações de CC<sub>50</sub> dos compostos utilizados neste trabalho foram realizadas segundo a metodologia descrita em 4.9 e os resultados obtidos estão resumidos nos gráficos 1 a 10 e resumidas no quadro 2.

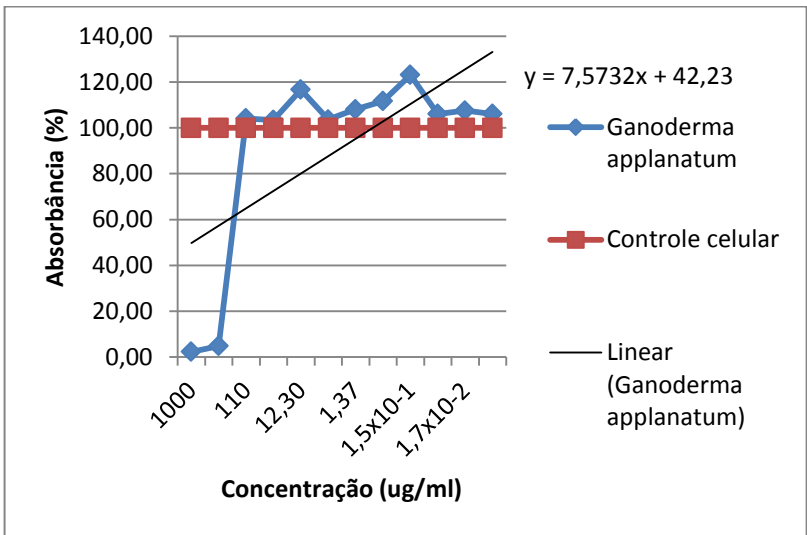
Quadro 2: Concentrações iniciais dos compostos de *Ganoderma* para a triagem de suas potenciais ações antivirais contra o vírus rábico.

Composto	Concentração inicial (abaixo da CC <sub>50</sub> )	Redução de efeito citopático
Extrato de <i>Ganoderma</i> <i>applanatum</i>	110µg/ml	Não

Extrato de <i>G. lucidum</i> Extrato de <i>Ganoderma</i> sp.	110µg/ml	Não
Cetamina	37µg/ml	Não
Ácido aplanoxídico A	110µg/ml	Não
Ácido aplanoxídico C	110µg/ml	Não
Ácido aplanoxídico F	110µg/ml	Não
Ácido aplanoxídico G	37µg/ml	Não
GA1	37µg/ml	Não
GA2	12,30µg/ml	Não

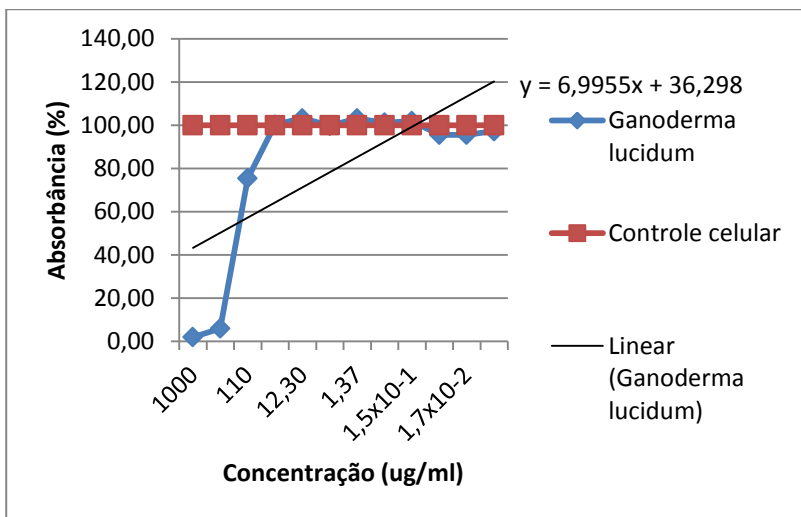
### *Ganoderma applanatum*

Gráfico 1: Curva de citotoxicidade de *Ganoderma applanatum* em porcentagem.



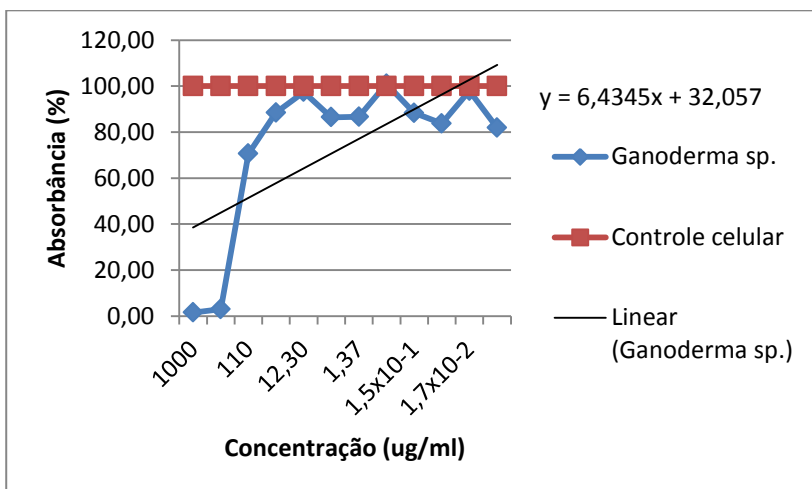
### *Ganoderma lucidum*

Gráfico 2: Curva de citotoxicidade de *Ganoderma lucidum* em porcentagem.



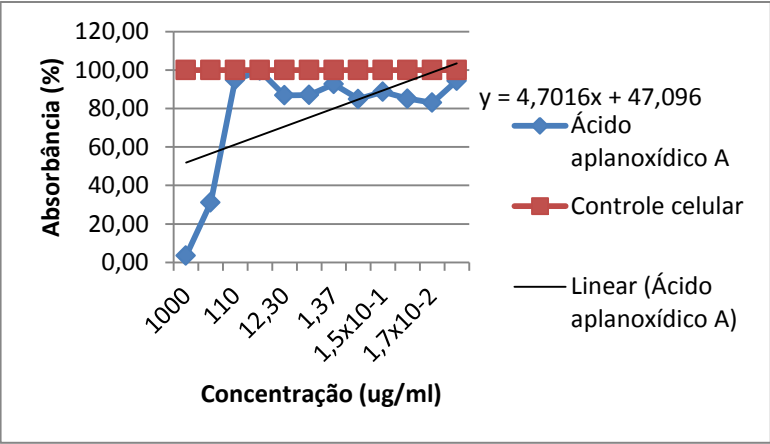
### *Ganoderma* sp.

Gráfico 3: Curva de citotoxicidade de *Ganoderma* sp. em porcentagem.



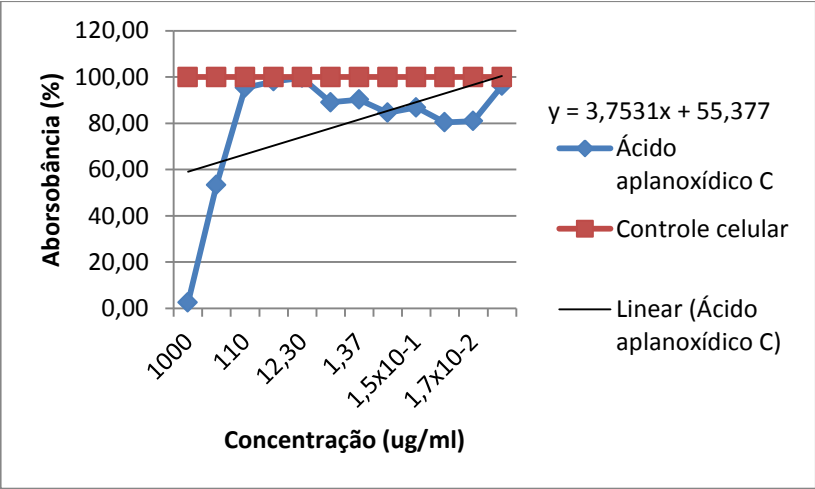
### Ácido aplanoxídico A

Gráfico 4: Curva de citotoxicidade de ácido aplanoxídico A em porcentagem.



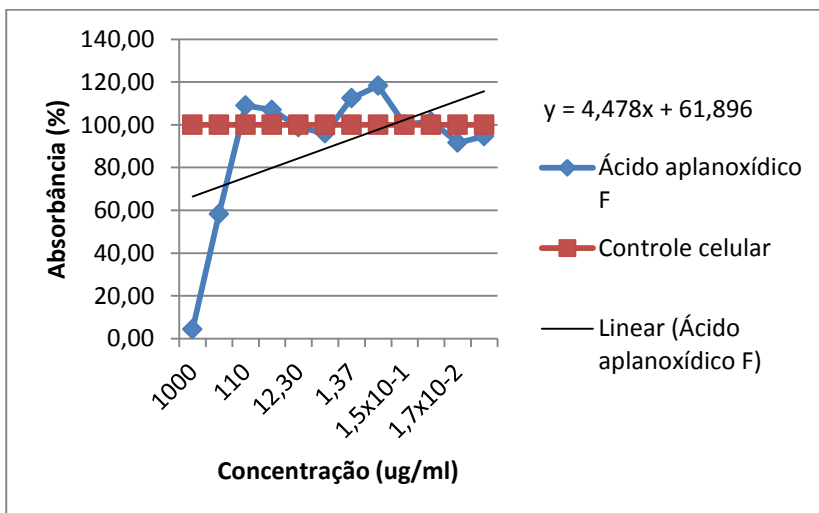
Ácido aplanoxídico C

Gráfico 5: Curva de citotoxicidade de ácido aplanoxídico C em porcentagem.



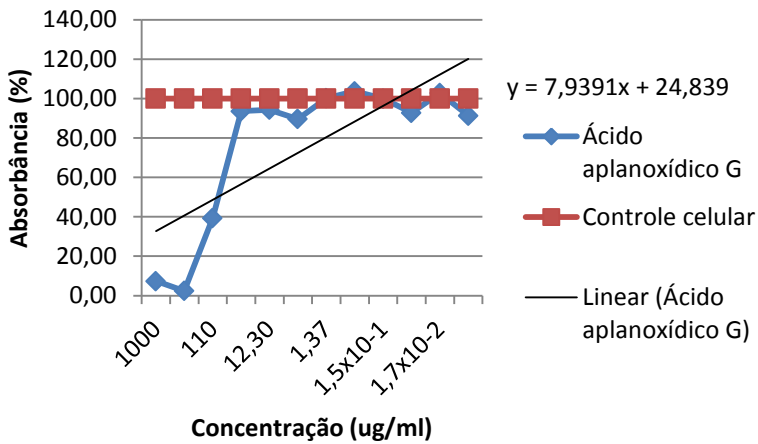
## Ácido aplanoxídico F

Gráfico 6: Curva de citotoxicidade de ácido aplanoxídico F em porcentagem.



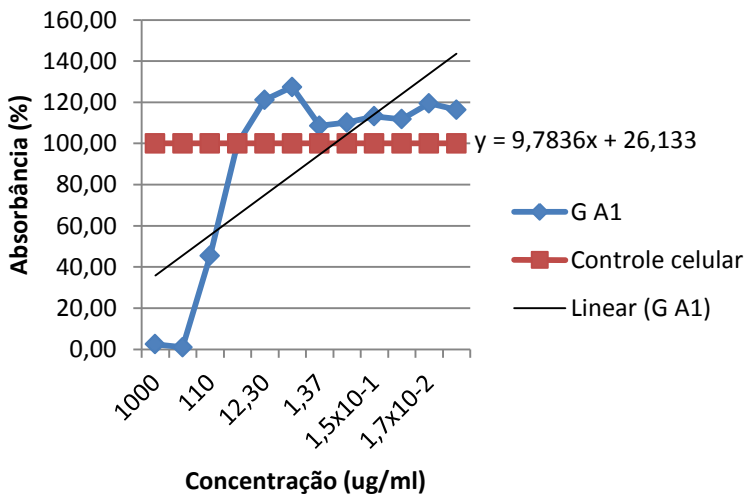
## Ácido aplanoxídico G

Gráfico 7: Curva de citotoxicidade de ácido aplanoxídico G em porcentagem.



## G A1

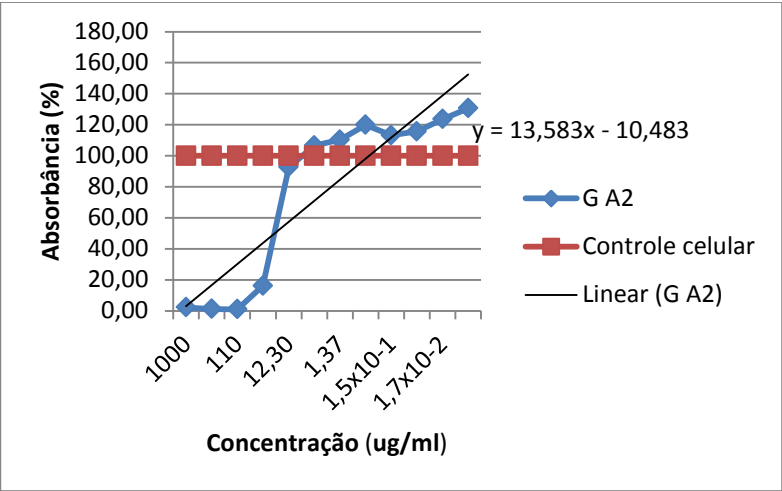
Gráfico 8: Curva de citotoxicidade de G A1 em porcentagem.



## G A2

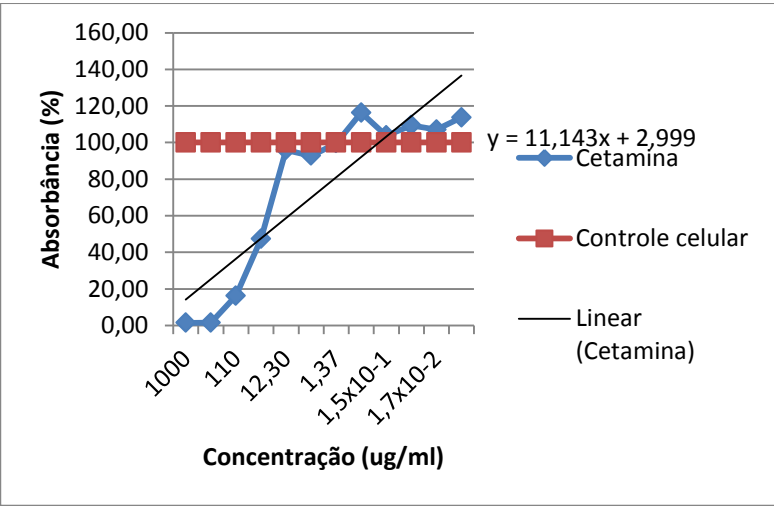


Gráfico 9: Curva de citotoxicidade de G A2 em porcentagem.



### Cetamina

Gráfico 10: Curva de citotoxicidade de cetamina em porcentagem.



#### 4.3. Triagem da potencial atividade anti-rábica através da observação de inibição do efeito citopático viral

A triagem dos compostos foi realizada conforme descrita na metodologia 4.10 e os resultados encontrados foram observados em microscópio invertido Olympus® e fotografados para melhor serem analisados.

Nas triagens realizadas com os extratos de *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum* e *Ganoderma* sp., foi utilizado o estoque-viral A na diluição 1/2. Nas triagens realizadas com os ácidos aplanoxídicos A, C, F e G e os compostos GA1 e GA2, foi utilizado o estoque-viral B em sua forma pura.

As figuras 16 a 24 mostram os resultados obtidos em cada experimento.

##### *Ganoderma applanatum*

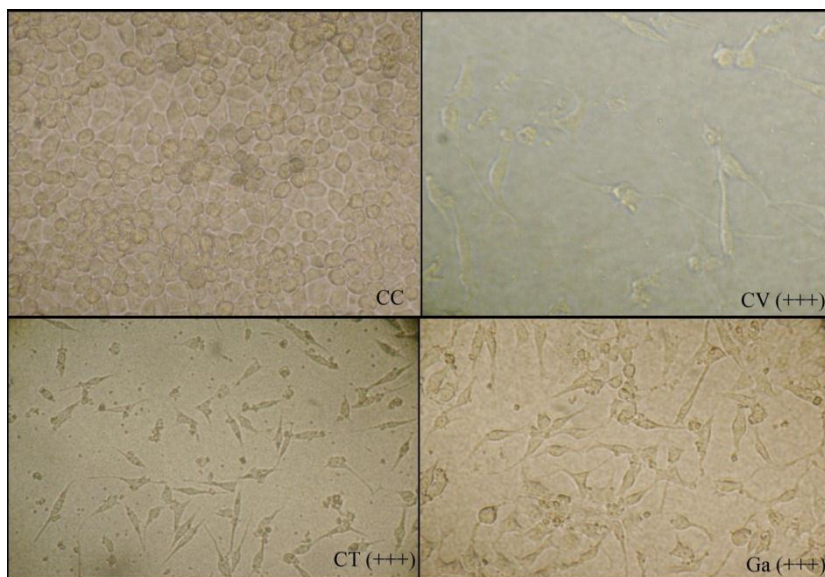


Figura 16: Infecção de células McCoy com vírus rábico CVS: CC: Controle celular; (+++): Tapete celular totalmente irregular, células danificadas; CV: Controle viral (estoque-viral A); CT: Controle positivo de cetamina na concentração de 37µg/ml; Ga: Infecção celular pelo vírus da raiva em células McCoy imersas em extrato de *Ganoderma applanatum* na concentração 110 µg/ml.

### ***Ganoderma lucidum***

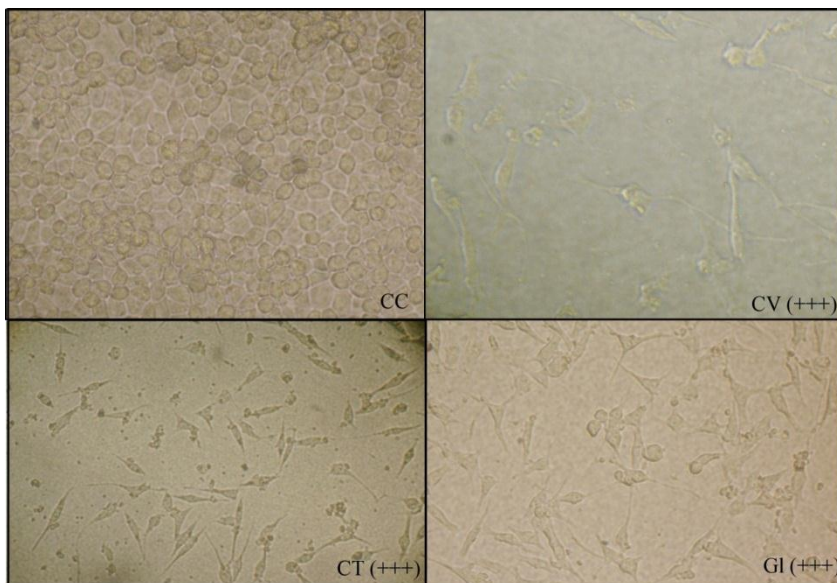


Figura 17: Infecção de células McCoy com vírus rábico CVS: CC: Controle celular; (+++): Tapete celular totalmente irregular, células danificadas; CV: Controle viral (estoque-viral A); CT: Controle positivo de cetamina na concentração de 37µg/ml; Ga: Infecção celular pelo vírus da raiva em células McCoy imersas em extrato de *Ganoderma lucidum* na concentração 110 µg/ml.

### ***Ganoderma sp.***

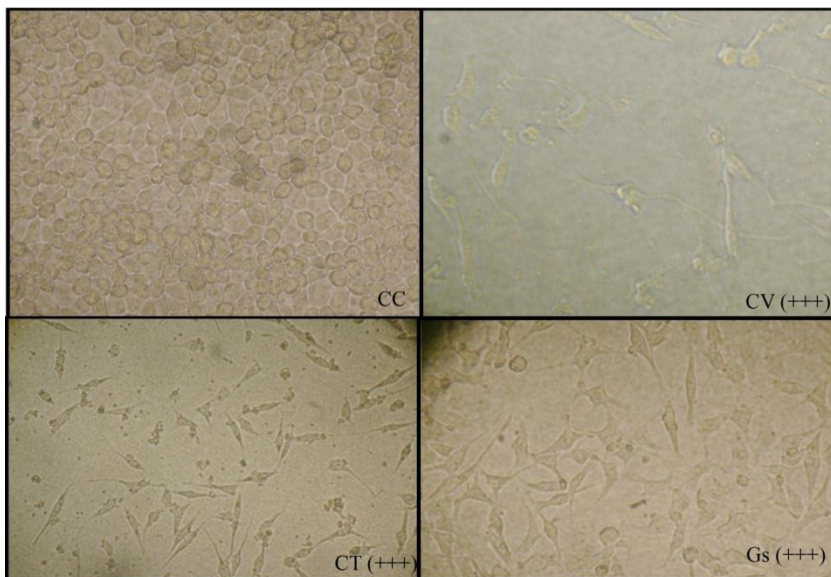


Figura 18: Infecção de células McCoy com vírus rábico CVS: CC: Controle celular; (+++): Tapete celular totalmente irregular, células danificadas; CV: Controle viral (estoque-viral A); CT: Controle positivo de cetamina na concentração de 37 $\mu$ g/ml; Ga: Infecção celular pelo vírus da raiva em células McCoy imersas em extrato de *Ganoderma* sp. na concentração 110  $\mu$ g/ml.

### Ácido aplanoxídico A

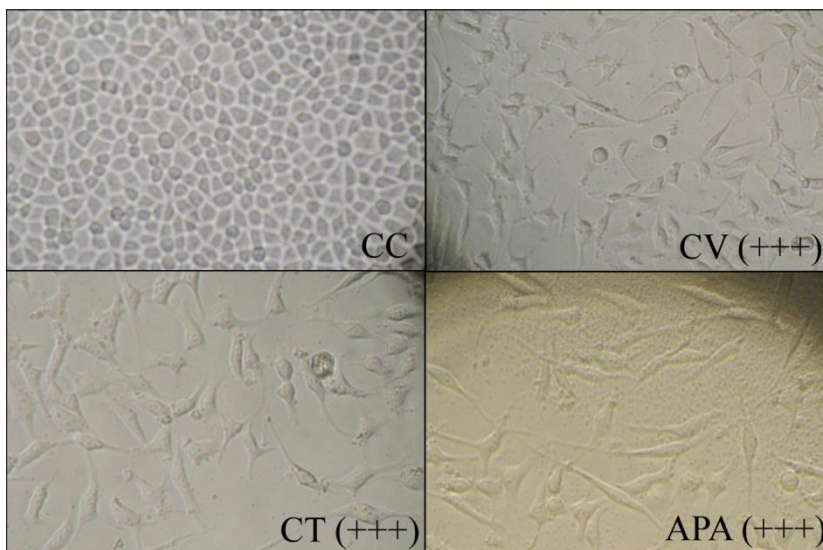


Figura 19: Infecção de células McCoy com vírus rábico CVS: CC: Controle celular; (+++): Tapete celular totalmente irregular, células danificadas; CV: Controle viral (estoque-viral B); CT: Controle positivo de cetamina na concentração de 37 $\mu$ g/ml; Ga: Infecção celular pelo vírus da raiva em células McCoy imersas em extrato de ácido aplanoxídico A na concentração 110  $\mu$ g/ml.

## Ácido aplanoxídico C

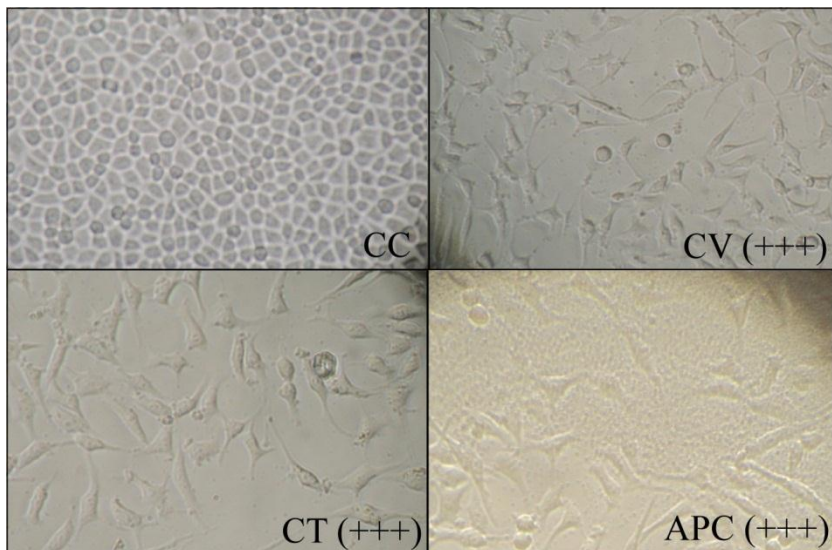


Figura 20: Infecção de células McCoy com vírus rábico CVS: CC: Controle celular; (+++): Tapete celular totalmente irregular, células danificadas; CV: Controle viral (estoque-viral B); CT: Controle positivo de cetamina na concentração de 37 $\mu$ g/ml; Ga: Infecção celular pelo vírus da raiva em células McCoy imersas em ácido aplanoxídico C na concentração 110  $\mu$ g/ml.

## Ácido aplanoxídico F



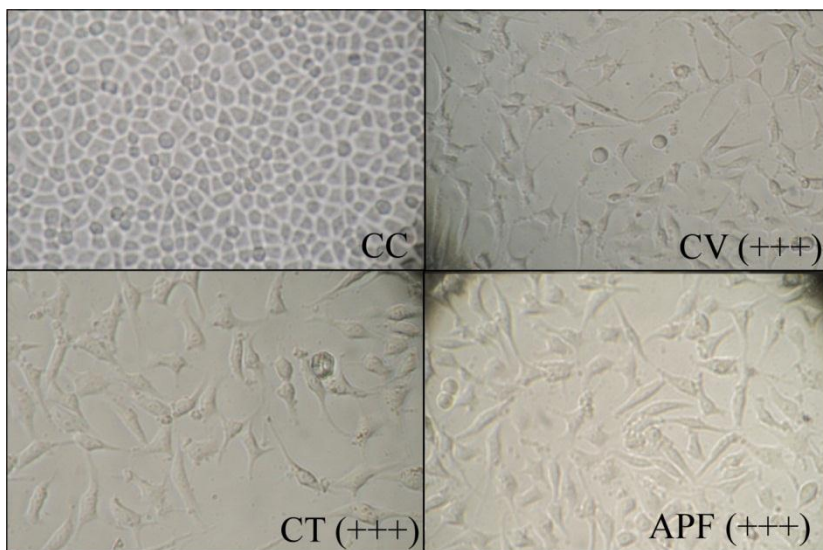


Figura 21: Infecção de células McCoy com vírus rábico CVS: CC: Controle celular; (+++): Tapete celular totalmente irregular, células danificadas; CV: Controle viral (estoque-viral B); CT: Controle positivo de cetamina na concentração de 37µg/ml; Ga: Infecção celular pelo vírus da raiva em células McCoy imersas em ácido aplanoxídico F na concentração 110 µg/ml.

### Ácido aplanoxídico G

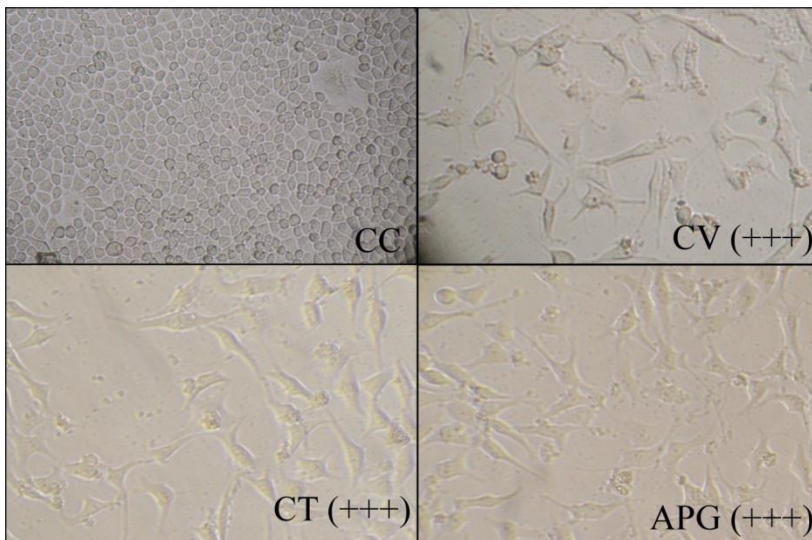


Figura 22: Infecção de células McCoy com vírus rábico CVS: CC: Controle celular; (+++): Tapete celular totalmente irregular, células danificadas; CV: Controle viral (estoque-viral B); CT: Controle positivo de cetamina na concentração de 37 $\mu$ g/ml; Ga: Infecção celular pelo vírus da raiva em células McCoy imersas em ácido aplanoxídico G. na concentração 37  $\mu$ g/ml.

## GA1



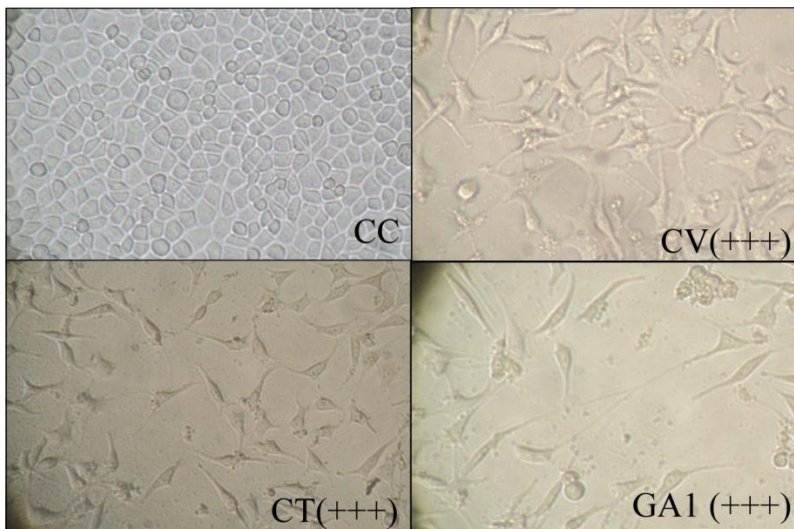


Figura 23: Infecção de células McCoy com vírus rábico CVS: CC: Controle celular; (+++): Tapete celular totalmente irregular, células danificadas; CV: Controle viral (estoque-viral B); CT: Controle positivo de cetamina na concentração de 37 $\mu$ g/ml; Ga: Infecção celular pelo vírus da raiva em células McCoy imersas em GA1 na concentração 37  $\mu$ g/ml.

## GA2

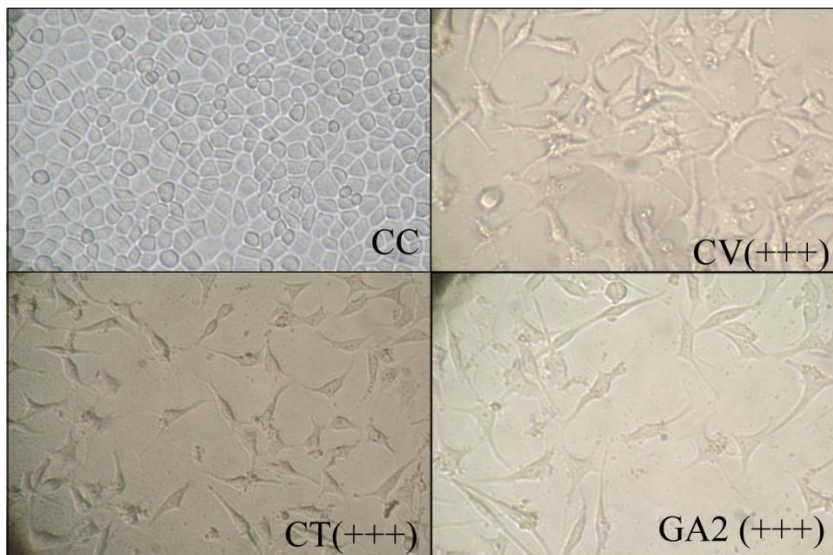


Figura 24: Infecção de células McCoy com vírus rábico CVS: CC: Controle celular; (+++): Tapete celular totalmente irregular, células danificadas; CV: Controle viral (estoque-viral B); CT: Controle positivo de cetamina na concentração de 37 $\mu$ g/ml; Ga: Infecção celular pelo vírus da raiva em células McCoy imersas em GA2 na concentração 12,30  $\mu$ g/ml.

A cetamina foi utilizada neste trabalho como controle positivo, pois ela é um agente anestésico, antagonista não competitivo do receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA), e a mesma está incluída no protocolo de Milwaukee. Neste, a cetamina é administrada em dose de 48mg/kg/dia sob a forma de infusão contínua. O Protocolo de Milwaukee foi utilizado com sucesso em uma paciente de 15 anos que mesmo apresentando os sintomas clássicos da raiva conseguiu ser curada da doença (Jackson, 2009).

Possui propriedades sedativas e analgésicas e tem a capacidade de atravessar rapidamente a barreira hematoencefálica (Jackson *et al.*, 2002).

Em altas concentrações (1–2 mM), a cetamina demonstra, em experimentos *in vitro*, inibir a replicação do vírus rábico, pela inibição da transcrição de seu genoma (Jackson *et al.*,2002).

Após inoculação esterotáxica de uma cepa de vírus fixo no *striatum* de camundongos, a administração de uma alta dose de cetamina (60mg/kg), após 12 horas da infecção, leva a redução da infecção em várias regiões cerebrais, como hipocampo, córtex cerebral e tálamo. Além disso, a distribuição topográfica do vírus da raiva no cérebro de roedores infectados sugere que os receptores NMDA possam ser os receptores nos quais o vírus rábico se liga. Por esses motivos a cetamina pode ser considerada como um potencial agente terapêutico no manejo da raiva humana, embora a dose segura desse medicamento não seja suficiente para exercer um efeito antiviral (Jackson *et al.*,2002).

Outro antagonista não competitivo dos receptores NMDA, o MK-801, utilizado em uma pesquisa de Tsiang e colaboradores, em 1991, foi avaliado em culturas neuronais infectadas com o vírus rábico. O efeito dependente da dose de MK-801 foi avaliado em culturas de células neuronais após a inoculação do vírus rábico. Passados três dias de inoculação, observou-se que dependendo da dose administrada de MK-801, houve uma inibição na produção do vírus em aproximadamente mil vezes, porém sem efeito virucida (Tsiang *et al.*,1991).

Em outro estudo, de Lockhart e colaboradores, em 1992, mostrou o efeito antiviral do anestésico cetamina contra o vírus rábico, porém o efeito também não foi virucida ou citopático. O efeito antiviral não foi relacionado a uma inibição da transcrição celular ou de tradução. Os resultados sugerem que a atividade viral envolveu a inibição da transcrição do genoma viral, entretanto um efeito adicional na replicação do genoma viral não pode ser descartado (Lockhart *et al.*,1992).

É possível que a inibição da transcrição do RNA mensageiro (mRNA) do vírus, mediada pela cetamina tenha modificado a

transcrição do seu genoma pela influência da quantidade de mRNAs. Contudo, a inibição não é completa e depois de um tempo há uma recuperação da transcrição viral normal.

Em estudos recentes atividade antiviral da cetamina foi observada em concentrações de mM, diferente das concentrações em  $\mu$ M, associadas com a atividade em receptores NMDA, sugerindo um mecanismo de ação alternativo e também, não há evidências que suportam a ação neuroprotetora da cetamina, tanto *in vitro* como *in vivo*. Portanto, é questionável que um efeito neuroprotetor de sua utilização em uma terapia administrada em uma paciente, tenha sido o principal responsável pela recuperação da paciente, sendo mais provável que a paciente tenha se recuperado devido à terapia de apoio (Jackson, 2009).

Nos resultados obtidos neste trabalho não se verificou redução de efeito citopático pela cetamina como foi observado no trabalho de Chávez, 2005, portanto mesmo que algum dos compostos testados tenha apresentado alguma redução de efeito citopático, o mesmo não poderia ser comparado a um controle positivo.

O gênero *Ganoderma* tem grande importância e tem sido utilizado há mais de dois milênios na medicina tradicional da China e do Japão para o tratamento de diversas doenças humanas, tais como hepatopatias, nefrites, hipertensão, hiperlipemia, artrites, diabetes, anorexia, asma, bronquite, úlceras gástricas e neoplasias. Acredita-se que seu consumo regular tenha efeitos positivos na vitalidade e longevidade (Eo *et al.*, 1999; Junior *et al.*, 1999; Boh *et al.*, 2000; Gerber *et al.*, 2000; Smânia *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; Paterson, 2006; Yang *et al.*, 2007).

Apesar de estes fungos serem utilizados há muitos séculos, estudos sobre suas atividades farmacológicas tiveram início a pouco mais de 25 anos. Esses estudos são realizados a partir do isolamento e identificação de substâncias bioativas do basidioma e do micélio das espécies de *Ganoderma* (Boh *et al.*, 2000; Gerber *et al.*, 2000).

Dentre as pesquisas realizadas com esses fungos destacam-se as que investigam suas atividades biológicas como antialérgicos, imunomoduladores, imunossupressores e imunoestimuladores, também no tratamento de HIV, antitumorais, e proteção e desintoxicação hepática (Boh *et al.*, 2000).

Dentre as mais de 250 espécies deste gênero, se destacam *Ganoderma lucidum* e *Ganoderma applanatum*. Isso por que o gênero *Ganoderma* pode ser dividido em dois grupos, por suas características macroscópicas. São eles: O complexo *G. lucidum*, o qual compreende as espécies que possuem a superfície do píleo lacada, e o complexo *G. applanatum*, o qual compreende espécies com a superfície do píleo não lacada (Gerber *et al.*, 2000; Smânia *et al.*, 2007).

A espécie mais estudada atualmente deste gênero é *Ganoderma lucidum* devido ao seu grande interesse comercial e medicinal. Dela podem ser extraídos mais 119 triterpenóides, sendo que muitos deles apresentam atividades biológicas já descritas (Junior *et al.*, 1999; Gerber *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2004; Smânia *et al.*, 2007).

De *G. lucidum* podem ser extraídos compostos como os ácidos ganodérmicos B e C, os quais inibem a liberação de histamina por mastócitos, bem como, o crescimento de células tumorais do fígado (Eo *et al.*, 1999 ).

A administração oral de *G. lucidum* parece ser bastante segura, já que seu extrato não apresenta toxicidade. Com isso, seu potencial de ação contra doenças humanas merece ser investigado (Eo *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2004). A citotoxicidade mostrada no gráfico 2 nas concentrações de 1000 a 330µg/ml, são, provavelmente, apresentadas devido ao solvente utilizado, dimetilsulfóxido (DMSO).

Algumas das pesquisas já realizadas mostram que em sua atividade anti-herpética, *G. lucidum* é um potente promissor. Outras pesquisas demonstram que *G. lucidum* pode induzir apoptose, inibir a

proliferação celular e suprimir a migração de células PC-3, um tipo bastante invasivo de câncer de próstata. Entretanto, o mecanismo molecular envolvido e responsável pelos seus efeitos inibitórios ainda não foram elucidados (Liu *et al.*, 2004; Paterson, 2006).

Outro exemplo de sua atividade biológica e a sua atividade antibacteriana. Extratos de *G. lucidum* mostram efeitos bactericidas contra bactérias Gram-positivas, efeitos inibitórios no crescimento de *Bacillus subtilis*. Algumas pesquisas também mostram seu efeito anti-inflamatório (Paterson, 2006).

Polissacarídeos extraídos de *G. lucidum* também podem apresentar atividades biológicas, como atividade antitumoral contra sarcoma 180 em camundongos, e quando combinados com drogas antitumorais, apresentam efeitos aditivos ou até mesmo sinérgicos (Junior *et al.*, 1999).

O fungo *Ganoderma applanatum*, também bastante utilizado em estudos científicos, apresenta atividades antitumoral, antibiótica, antiviral, bem como alguma atividade imunológica (Yang *et al.*, 2007).

Diversos grupos de compostos podem ser extraídos de *Ganoderma* spp., sendo eles isolados principalmente do micélio e corpo frutífero. Os principais compostos extraídos são triterpenóides, polissacarídeos, proteínas, esteroides e enzimas. Os efeitos de importância farmacêutica são atribuídos principalmente aos polissacarídeos e triterpenóides (Boh *et al.*, 2000; Gerber *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2004).

Nesse gênero são encontrados mais de 100 triterpenos, como ácidos aplanoxídicos, ácidos ganodérmicos, sendo que a maioria dos triterpenos isolados de *Ganoderma* spp. não são encontrados em outros gêneros. Os triterpenos são considerados como potenciais agentes antitumorais, devido a sua atividade na inibição do crescimento celular de tumores, além de sua citotoxicidade contra células tumorais.

Triterpenos possuem também atividade contra proteases do vírus HIV-1 e HIV-2 (Boh *et al.*, 2000; Gerber *et al.*, 2000; Paterson, 2006).

Possuem também atividade anti-hepatotóxica, anti-hipertensiva, anti-histamínica e hipocolesterolêmico. Alguns estudos mostram também que os triterpenos isolados de *Ganoderma* spp. apresentam atividade antioxidativa, de hepatoproteção e no controle da hipertensão (Boh *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2004).

Os esteróis GA1 e GA2, também extraídos de *Ganoderma* spp., assim como os ácidos applanoxídicos A, C, F e G demonstraram possuir atividade antifúngica contra *Microsporum canis* e *Trichophyton mentagrophytes*, agindo na inibição de crescimento, em concentrações de 500 a 1000µg/ml (Smânia *et al.*, 2003).

Apesar de várias pesquisas demonstrarem as atividades biológicas de extratos de diferentes espécies de *Ganoderma* e seus derivados, pode-se observar nas figuras 16 a 24, mostradas acima, que não se verifica a redução de efeito citopático causado pelo vírus rábico em células McCoy, quando comparadas ao controle viral e por esse motivo, não se podem ser determinados índices de seletividade para os compostos utilizados.

Devido a grande importância da doença, principalmente em áreas endêmicas e regiões mais pobres do mundo e também pelo alto valor econômico gasto no tratamento da raiva são necessárias mais pesquisas com enfoque na descoberta de novos antivirais.

## **5. CONCLUSÕES**

O ensaio com o MTT se mostrou viável para a determinação das concentrações citotóxicas dos compostos utilizados.

Os níveis de toxicidade dos compostos foram baixos.

A triagem dos compostos pela inibição do efeito citopático não se mostrou adequada.

A inibição de efeito citopático não foi observada em nenhuma das repetições do experimento, tanto para os compostos, quanto para o controle positivo com cetamina.



## 6. REFERÊNCIAS

Aguiar, Tereza D`ávila de Freitas *et al.* Risco de transmissão do vírus da raiva oriundo de sagui (*Callithrix jacchus*), domiciliado e semidomiciliado, para o homem na região metropolitana de Fortaleza, Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasil, v.44, n.3, p.356-363, mai./jun. 2011.

Albas, Avelino *et al.* Os morcegos e a raiva na região oeste do estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasil, v.44, n.2, p.201-205, mar./abr. 2011.

Badrane, Hassan *et al.* Evidence of two *Lyssavirus* phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. **Journal of virology**, França, v.75, n.7, p.3268-3276, abr.2001.

Bijlenga, G.; Heaney, T. Post-exposure local treatment of mice infected with rabies with two axonal flow inhibitors, colchicine and vinblastine. **Journal of General Virology**, França, v.39, n.2, p.381-385, mai. 1978.

Boh, Bojana *et al.* Isolation and Quantification of Triterpenoid Acids from *Ganoderma applanatum* of Istrian Origin. **Food Technology and Biotechnology**, Slovênia, v.38, n.1, p.11-18, jan. 2000.

Brito, Mariana Gontijo *et al.* Antemortem diagnosis of human rabies in a veterinarian infected when handling a herbivore in Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasil, v.53, n.1, p.39-44, jan./fev. 2011.

Bronnert, Jan *et al.* Organ transplantations and rabies transmission. **Journal of Travel Medicine**, Estados Unidos, v.14, n.3, p.177-180, abr. 2007.

Carneiro, Nídia Franscisca de Figueiredo *et al.* Raiva em morcegos *Artibeus lituratus* em Montes Claros, Estado de Minas Gerais. **Revista**

**da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasil, v.42, n.4, p.449-451, jul./ago. 2009.

Charlton, K. M.; Casey, G. A. Experimental rabies in skunks: oral, nasal, tracheal and intestinal exposure. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, Canada, v.43, n.2, p.168-172, abr. 1979.

Chávez, Juliana Helena. **Avaliação da atividade anti-rábica *in vitro* de compostos fenólicos sintéticos**. 2005. 112 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Consales, Cleide *et al.* Cytopathic effect induced by rabies virus in McCoy cells. **Journal of Virological Methods**, Brasil, v.27, n.3, p.277-285, mar. 1990.

Coulon, Patrice *et al.* Invasion of the peripheral nervous systems of adult mice by the CVS strain of rabies virus and its avirulent derivative AvOl. **Journal of Virology**, Suíça, v.63, n.8, p.3550-3554, ago. 1989.

De Clercq, Erik. Strategies in the design of antiviral drugs. **Nature Reviews. Drug Discovery**, Bélgica, v.1, n.1, p.13-25, jan. 2002.

De Clercq, Erik. Antiviral drugs in current clinical use. **Journal of Clinical Virology**, Bélgica, v.30, n.2, p.115-133, jun. 2004.

De Clercq, Erik; Field, Hugh. Antiviral prodrugs – The development of successful prodrug strategies for antiviral chemotherapy. **British Journal of Pharmacology**, Bélgica, v.147, n. 1, p.1-11, jan. 2006.

De Clercq, Erik. Antiviral therapy: *quo vadis?* **Future Medicine Chemistry**, Bélgica, v.2, n.7, p.1061-1067, jul. 2010.

Eisenbrand, G. *et al.* Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, Alemanha, v.40, n.2-3, p.193-236, fev./mar. 2002.

Eo, Seong-Kug *et al.* Antiherpetic activities of various protein bound polysaccharides isolated from *Ganoderma lucidum*. **Journal of Ethnopharmacology**, Coréia do Sul, v.68, p.175-181, mai. 1999.

Gerber, Alexandra Lehmkuhl *et al.* Triterpenes and sterols from *Ganoderma australe* (fr.) pat. (aphyllophoromycetideae). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, Brasil, v.2, p.303-311, 2000.

Hayman, David *et al.* Evolutionary history of rabies in Ghana. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, Reino Unido, v.5, n.4, p.1-10, abr. 2011.

Jackson, Alan *et al.* Management of rabies in humans. *Clinical Infectious Diseases*, Canada, v.36, n.1, p.60-63, jan. 2002

Jackson, Alan. Rabies. *Neurologic Clinics*, Canada, v.26, n.3, p.717-726, ago. 2008.

Jackson, Alan. Therapy of rabies encephalitis. **Biomédica**, Colômbia, v.29, n.2, p.169-176, jun. 2009.

Jackson, Alan. Update on rabies. *Research and Reports in tropical Medicine*, Canada, v.2, p.31-43, fev. 2011.

Junior, Artur Smânia *et al.* Antibacterial activity of steroidal compounds isolated from *Ganoderma applanatum* (Pers.) pat. (aphyllophoromycetideae) fruit body. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, Brasil, v.1, p.325-330, 1999.

Kotait, Ivanete; Carrieri, Maria Luiza; Takaoka, Neide Yumie. Manual técnico do Instituto Pasteur, número 8. Raiva Aspectos gerais e clínica, São Paulo, 2009.

Lépine, Pierre. On the evolution of fixed strains of rabies virus. *The Journal of Hygiene*, França, v.38, n.2, p.180-184, mar. 1938.

Liu, Yuanbin *et al.* Mechanism of Cellular 3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5- Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. **Journal of Neurochemistry**, Estados Unidos, v.69, n.6, p.2285-2293, ago. 1997.

Liu, Jing *et al.* Possible mode of action of antitherpetic activities of a proteoglycan isolated from the mycelia of *Ganoderma lucidum* in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, China, v.95, p.265-272, set. 2004.

Lockhart, Brian; Tordo, Noel; Tsiang, Henry. Inhibition of rabies vírus transcription in rat cortical neurons with the dissociative anesthetic ketamine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, França, v.36, n.8, p.1750-1755, ago. 1992.

Lycke, Erik.; Tsiang, Henry. Rabies virus infection of cultured rat sensory neurons. **Journal of Virology**, França, v.61, n.9, p.2733-2741, set. 1987.

Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 5a ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2002.

Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6a ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2005.

Nogueira, Yeda. Morphometric analysis of McCoy cells inoculated with cerebrospinal fluid from patients with rabies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Brasil, v.93, n.4, p.509-514, jul./ago. 1998.

Nogueira, Yeda. **Validação de um novo método de isolamento de vírus rábico. Prevalência de vírus rábico em morcegos albergados no Parque Estadual Intervales, Estado de São Paulo: estudo comparativo entre duas metodologias**. 2001. 87 p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

Paterson, Russel. *Ganoderma – A therapeutic fungal biofactory*. **Phytochemistry**, Portugal, v.67, p.1985-2001, ago. 2006.

Prehaud, Christophe *et al.* Antigenic site II of *Rabies virus* glycoprotein: structure and role in viral virulence. **Journal of Virology**, França, v.62, n.1, p.1-7, jan. 1988.

Real, Eleènore *et al.* Antiviral Drug Discovery Strategy Using Combinatorial Libraries of Structurally Constrained Peptides. **Journal of Virology**, França, v.78, n.14, p.7410-7414, jul. 2004.

Schnell, Matthias *et al.* The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain. **Nature Reviews. Microbiology**, Estados Unidos, v.8, n.1, p.51-61, jan. 2011.

Smânia, Elza de Fátima *et al.* Antifungal activity of sterols and triterpenes isolated from *Ganoderma annulare*. **Fitoterapia**, Brasil, v.74, p.375-377, fev. 2003.

Smânia, Elza de Fátima *et al.* Antimicrobial activity of methyl australate from *Ganoderma australe*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Brasil, v.17, n.1, p.14-16, mar. 2007.

Smee, Donald *et al.* Comparison of colorimetric, fluorometric, and visual methods for determining anti-influenza (H1N1 and H3N2) virus activities and toxicities of compounds. **Journal of Virological Methods**, Estados Unidos, v.106, p.71-79, jun. 2002.

Takeuchi, Hitoshi; Baba, Masanori; Shigeta, Shiro. An application of tetrazolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-herpes simplex virus compounds. **Journal of Virological Methods**, Japão, v.33, n.1-2, p.61-71, jun. 1991.

Teixeira, Thais Fumaco *et al.* Estudo antigênico de amostras do vírus da raiva isoladas no Rio Grande do sul, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, Brasil, v.33, n.3, p.271-275, mai. 2005.

Tsiang, Henry *et al.* Inhibition of Rabies Virus Infection in Cultured Rat Cortical Neurons by an N-Methyl-D-Aspartate Noncompetitive

Antagonist, MK-801. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, França, v.35, n.3, p. 572-574, jan. 1991.

Turner, G. S.; Kaplan, C.: Some properties of fixed rabies virus. **The Journal of General Virology**, Reino Unido, v.1, n.4, p.537-551, out. 1967.

Vieira, L. F. P. *et al.* Caracterização molecular do vírus da raiva de *Desmodus rotundus* capturados no Estado do Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Brasil, v.62, n.2, p.343-349, abr. 2010.

Wilkinson, Lise. History. Termo *In*: Jackson, Alan; Wunner, Willian. **Rabies**. Estados Unidos: Elsevier, 2002. P. 1-23.

Willoughby, Rodney *et al.* Survival after treatment of rabies with induction of coma. **The New England Journal of Medicine**, Estados Unidos, v.352, n.24, p.2508-2514, jun. 2005.

World Health Organization: **Weekly epidemiological record**, n.14. Abr. 2002

World Health Organization: **WHO Expert Consultation on Rabies**. First report. Geneva: World Health Organization; 2005. 121p. (Technical Report Series; 931).

World Health Organization: **The Immunological Basis for Immunization Serie**. Module 17: Rabies, 2011.

Yang, Byung-Keun; Jung, Yu-Sun; Song, Chi-Hyun. Hypoglycemic Effects of *Ganoderma applanatum* and *Collybia confluens* Exopolymers in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. **Phytotherapy Research**, Coréia do Sul, v.21, p.1066-1069, jun. 2007.

<http://www.cdc.gov/rabies/transmission/virus.html> (consultado em 15/05/11)

<http://www.mycology.com/BurkinaFaso/Polypore.htm> (consultado em 12/12/11)

<http://www.first-nature.com/fungi/ganoderma-applanatum.php> (consultado em 12/12/11)

<http://www.mushroomthejournal.com/greatlakesdata/Taxa/Ganodlucid143.html> (consultado em 12/12/11)